

**Systemische Effekte von inhalierten ultrafeinen  
Kohlenstoffpartikeln in Hinblick auf entzündliche Effekte  
und kardiovaskuläre Erkrankungen**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Dariusch Ettehadieh

22. April 2009

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Weiß
Sonderberichterstatter:	Prof. Dr. H. Schulz
Tag der mündlichen Prüfung:	14. Januar 2010

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung.....	1
2	Literaturreview.....	6
2.1	Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	6
2.2	Gesundheitseffekte durch Feinstaub.....	6
2.2.1	Epidemiologische Befunde.....	7
2.2.1.1	Feinstaubbelastung und Mortalität.....	7
2.2.1.2	Feinstaubbelastung und Morbidität.....	8
2.2.1.2.1	Pulmonale Befunde.....	8
2.2.1.2.2	Kardiovaskuläre Befunde.....	8
2.2.1.2.2.1	<i>Systemische Entzündungsreaktion.....</i>	9
2.2.1.2.2.2	<i>Gerinnungsfördernder Status.....</i>	10
2.2.1.2.2.3	<i>Endothelaktivierung und endotheliale Dysfunktion.....</i>	11
2.2.1.2.2.4	<i>Progression artherosklerotischer Prozesse.....</i>	11
2.2.1.2.2.5	<i>Störung des vegetativen Nervensystems und der Gefäßmotorik.....</i>	12
2.2.1.2.2.6	<i>Herzrhythmusstörungen.....</i>	13
2.2.2	Experimentelle toxikologische Studien.....	14
2.2.2.1	Pulmonale Befunde.....	14
2.2.2.2	Kardiovaskuläre Befunde.....	16
2.2.2.2.1	Systemische Entzündungsreaktion.....	16
2.2.2.2.2	Gerinnungsfördernder Status.....	16
2.2.2.2.3	Endothelaktivierung und endotheliale Dysfunktion.....	17
2.2.2.2.4	Progression artherosklerotischer Prozesse.....	18
2.2.2.2.5	Störung des vegetativen Nervensystems und der Gefäßmotorik.....	18
2.2.2.2.6	Herzrhythmusstörungen.....	19
2.3	Pathophysiologische Wirkungen.....	20
2.3.1	Pulmonale Mechanismen.....	21
2.3.1.1	Oxidativer Stress.....	22
2.3.1.2	Entzündungsreaktion.....	23
2.3.2	Systemische Mechanismen.....	24
2.3.2.1	Akute-Phase-Reaktion.....	24
2.3.2.2	Gerinnungsfördernder Status.....	24
2.3.2.3	Endothelaktivierung und endotheliale Dysfunktion.....	25
2.3.2.4	Progression artherosklerotischer Prozesse.....	27
2.3.2.5	Störung des vegetativen Nervensystems und der Gefäßmotorik.....	27
2.3.2.6	Herzrhythmusstörungen.....	28
2.4	Entstehung systemischer Effekte – Mediatoren aus der Lunge oder Translokation ultrafeiner Partikel?.....	29
2.5	Was befindet sich in der Umweltluft – Feinstaub & UfP.....	31
2.6	Einfluss ultrafeiner Partikel auf das kardiovaskuläre System.....	33
3	Versuchstiere und Methoden.....	35
3.1	Versuchstiere.....	35
3.1.1	Mäuse.....	35
3.1.2	Tierhaltung.....	35
3.1.3	Tierversuchsgenehmigung.....	35
3.2	Methoden.....	35
3.2.1	Applikationsformen von UfCP.....	35
3.2.1.1	Studiendesign.....	36

3.2.1.2	Inhalation.....	37
3.2.1.2.1	Experimenteller Aufbau.....	37
3.2.1.2.2	Durchführung der Inhalation.....	37
3.2.1.2.3	Berechnung translozierter UfCP-Anzahl nach 24 Stunden Inhalation für die intraarterielle Infusion.....	38
3.2.1.3	Intraarterielle Infusion.....	39
3.2.1.3.1	Versuchsaufbau.....	39
3.2.1.3.2	Bestimmung der zu infundierenden Partikelkonzentration.....	40
3.2.1.3.3	Herstellung ultrafeiner Kohlenstoffpartikel-Suspensionen.....	41
3.2.1.3.4	Bestimmung infundierter UfCP-Anzahl.....	42
3.2.1.3.5	Versuchsdurchführung (chirurgische Operation).....	43
3.2.2	Aufarbeitung der Versuchstiere.....	45
3.2.2.1	Narkose zur Einschläferung.....	45
3.2.2.2	Blutentnahme.....	45
3.2.2.3	Bronchoalveoläre Lavage.....	45
3.2.2.4	Organentnahme.....	46
3.2.3	Untersuchung biologischer Endpunkte.....	46
3.2.3.1	Klinisch-chemische Parameter der BAL-Lösung.....	46
3.2.3.1.1	Gesamtzellzahl.....	46
3.2.3.1.2	Zelldifferenzierung.....	47
3.2.3.1.3	Gesamtprotein.....	47
3.2.3.2	Genexpressionsanalyse.....	48
3.2.3.2.1	Isolation von RNA aus Mausgewebe ( <i>QIAGEN Rneasy Mini Kit</i> ).....	48
3.2.3.2.2	Fotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	49
3.2.3.2.3	Qualitätskontrolle der aufgereinigten RNA.....	50
3.2.3.2.4	Reverse Transkription von RNA.....	50
3.2.3.2.5	Quantitative Analyse der Genexpression mit RT-qPCR.....	50
3.2.3.2.6	Primerpaar-Validierung.....	52
3.2.3.3	Untersuchungsmethoden auf Proteinebene.....	52
3.2.3.3.1	Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischem Gewebe.....	52
3.2.3.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	53
3.2.3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	53
3.2.3.3.4	Westernblot-Analyse.....	53
3.2.3.3.5	<i>Searchlight-Multiplex-Proteinexpressionsanalyse</i> .....	55
3.2.3.3.6	<i>Multiplex-Suspension-Protein-Array-System</i> zur Quantifizierung von Zytokinen (Mediatoren).....	55
3.2.3.3.6.1	<i>Bioplex – Zytokinkonzentrationsbestimmung</i> .....	56
3.2.3.3.6.2	<i>Lincoplex – Cardiovascular disease panel (CVD)</i> .....	57
3.2.3.3.7	Histologie.....	58
3.2.3.3.7.1	<i>Entwässerung und Paraffineinbettung von Gewebe</i> .....	58
3.2.3.3.7.2	<i>Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitten</i> .....	58
3.2.3.3.7.3	<i>Immunhistochemische Färbungen</i> .....	58
3.2.3.3.8	Hämatologische Analyse.....	60
3.2.3.3.8.1	<i>Prinzip des ADVIA 120</i> .....	60
3.2.3.3.8.2	<i>ADVIA 120 – Software und Auswertung</i> .....	60
3.2.3.3.9	FACS – Analyse von Leukozyten durch Aktivierungsmarker.....	60
3.2.4	Statistik.....	65
4	Ergebnisse.....	66
4.1	Inhalation von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln (UfCP).....	66
4.1.1	Pulmonale Reaktion.....	66
4.1.1.1	Untersuchung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	66

4.1.1.2	Genexpressionsanalyse.....	67
4.1.1.3	Proteinexpressionsanalyse.....	69
4.1.1.4	Freisetzung von CXCL1 durch alveolare Epithelzellen.....	71
4.1.1.5	Fibrin(ogen)deposition detektierbar an Endothelzellen von kapillaren Blutgefäßen.....	72
4.1.2	Reaktion im Blut nach Inhalation von UfCP.....	74
4.1.2.1	Hämatologische Analyse.....	74
4.1.2.2	Analyse von Entzündungsmediatoren im Plasma.....	76
4.1.2.3	Analyse von Leukozytenaktivierung mittels FACS.....	77
4.1.3	Reaktion im Herz nach Inhalation von UfCP.....	79
4.1.3.1	Genexpressionsanalyse.....	79
4.1.3.2	Proteinexpressionsanalyse.....	79
4.1.3.3	Fibrin(ogen)deposition im Herz.....	80
4.1.4	Reaktion in der Aorta nach Inhalation von UfCP.....	81
4.1.5	Reaktion in der Leber nach Inhalation von UfCP.....	82
4.1.5.1	Genexpressionsanalyse.....	82
4.1.5.2	Proteinexpressionsanalyse.....	82
4.1.5.3	Fibrin(ogen)deposition in der Leber.....	83
4.2	Intraarterielle Infusion von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln (UfCP).....	84
4.2.1	Kontrollen der intraarteriellen Infusion.....	85
4.2.1.1	Proteinexpressionsanalyse.....	85
4.2.1.2	Hämatologische Analyse.....	86
4.2.1.3	Entzündungsmediatoren im Plasma.....	86
4.2.2	Pulmonale Reaktion nach Infusion von UfCP.....	88
4.2.3	Reaktion im Blut nach Infusion von UfCP.....	89
4.2.3.1	Hämatologische Analyse.....	89
4.2.3.2	Analyse von Entzündungsmediatoren im Plasma.....	90
4.2.3.3	Analyse von Leukozytenaktivierung mittels FACS.....	91
4.2.4	Reaktion im Herz nach Infusion von UfCP.....	91
4.2.4.1	Genexpressionsanalyse.....	91
4.2.4.2	Proteinexpressionsanalyse.....	92
4.2.4.3	Fibrin(ogen)deposition im Herz.....	92
4.2.5	Reaktion in der Aorta nach Infusion von UfCP.....	93
4.2.6	Reaktion in der Leber nach Infusion von UfCP.....	94
4.2.6.1	Genexpressionsanalyse.....	94
4.2.6.2	Proteinexpressionsanalyse.....	94
4.2.6.3	Fibrin(ogen)deposition in der Leber.....	94
5	Diskussion.....	96
5.1	Pulmonale und systemische Effekte nach Inhalation von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln (UfCP).....	98
5.1.1	Gesamtbild der pulmonalen Reaktion.....	98
5.1.2	Effekte auf biologische Marker im Blut.....	100
5.1.3	Reaktionen in sekundären Zielorganen induziert durch Inhalation von UfCP.....	102
5.1.3.1	Reaktion in der Aorta.....	102
5.1.3.2	Reaktion im Herz.....	103
5.1.3.3	Reaktion in der Leber.....	105
5.2	Pulmonale Effekte assoziiert mit der Infusion von UfCP (Validierung der Methoden).....	106
5.3	Vergleich von systemischen Effekten: UfCP-Inhalation versus UfCP-Infusion..	107
5.3.1	Herabgesetzte Plasma-Zytokinkonzentrationen und erhöhte Zellzahlen von	

	im Blut zirkulierenden Leukozyten sind unabhängig von der Partikeltranslokation.....	108
5.3.2	Aktivierung von Blutleukozyten abhängig von der pulmonalen Entzündungsreaktion.....	109
5.3.3	Abhängigkeit der erhöhten Thrombozytenzellzahlen, deren Aktivierungszustand und der Fibrin(ogen)deposition von der pulmonalen Entzündungsreaktion.....	109
5.3.4	Additivwirkung pulmonaler Entzündung und zirkulierender UfCP auf die Aorta.....	112
5.3.5	Pulmonale Entzündung als Auslöser der Effekte im Herz und in der Leber.....	113
5.3.5.1	Reaktion im Herz.....	113
5.3.5.2	Reaktion in der Leber.....	114
6	Zusammenfassung.....	117
7	Literaturverzeichnis.....	119
8	Anhang.....	133
8.1	Material.....	133
8.1.1	Abkürzungen.....	133
8.1.2	Geräteliste.....	137
8.1.3	Computerprogramme.....	138
8.1.4	Chemikalien.....	139
8.1.5	Enzyme.....	141
8.1.6	Gelmarker.....	141
8.1.7	Oligonukleotide für die RT-qPCR.....	141
8.1.8	Kits.....	144
8.1.9	Puffer und Lösungen (Rezepte).....	144
8.1.9.1	Immunhistologie.....	144
8.1.9.2	Intraarterielle Infusion.....	146
8.1.9.3	Aufarbeitung der exponierten Tiere.....	146
8.1.9.4	Isolation von RNA aus Mausgewebe.....	146
8.1.9.5	Gel für Elektrophorese.....	147
8.1.9.6	Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischem Gewebe.....	148
8.1.9.7	Westernblot.....	148
8.1.9.8	Durchflusszytometrie (FACS).....	149

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den weltweit häufigsten Todesursachen. Sie werden für ca. 30 % aller Todesfälle verantwortlich gemacht (Guilbert, 2003). Nach Schätzungen der *World Health Organisation* (WHO) starben allein im Jahre 2001 über 16,6 Millionen Menschen in der Welt an Erkrankungen, die das Herz- und Gefäßsystem des Körpers betrafen. Als Todesursache werden dabei Herzrhythmusstörungen, Herzinfarkte oder Herzversagen festgestellt (Morris et al., 1995; Peters et al., 2000; Schwartz et al., 1995). Klassische Faktoren, welche das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen wie Artherosklerose und Herzinfarkte erhöhen, sind bekannterweise Tabakkonsum sowie schlechte Ernährung, aber auch Diabetes und Fettleibigkeit.

Darüber hinaus haben epidemiologische Studien der letzten Jahrzehnte aufgezeigt, dass erhöhte Feinstaubkonzentrationen nicht nur mit pulmonaler sondern auch mit kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität assoziiert werden können (Peters et al., 2000; 2001; Pope et al., 2004a). Hauptverursacher des anthropogenen, d.h. des vom Menschen verursachten Anteils am Feinstaub in Deutschland sind laut Bundesumweltministerium (Stand 2001) die Industrie (35 %), die Privathaushalte und Klein-Verbraucher (19 %) und der Straßenverkehr (Dieselruß, 17 %), wobei bedingt durch lokale Gegebenheiten deutliche Variationen möglich sind. Man unterteilt die Luftschwebeteilchen (*particulate matter*, PM) in der Umwelt nach ihrem aerodynamischen Durchmesser in grobe Partikel (PM<sub>10</sub>, Ø < 10 µm), feine Partikel (PM<sub>2,5</sub>, Ø < 2,5 µm) und ultrafeine Partikel (UfP, PM<sub>0,1</sub>, Ø < 0,1 µm). Partikel, deren Durchmesser unter 2,5 µm liegt – also die feinen und ultrafeinen Luftschwebeteilchen – bilden den sogenannten Feinstaub und gelangen mit der Atmung in die Lungenperipherie.

Die molekularen Mechanismen, die zur Auslösung beziehungsweise Verschlechterung des systemischen kardiovaskulären Erkrankungsbildes führen, sind jedoch bislang weitgehend unbekannt. Epidemiologische Studien der letzten Jahre weisen auf die Inhalation von PM als Auslöser für die systemischen Entzündungsreaktionen mit anschließender Beeinflussung der kardiovaskulären Funktion hin (endotheliale Dysfunktion und prothrombotische Prozesse), die mit der Progression von pathophysiologischen kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert werden (Seaton et al., 1995; Schwartz et al., 2001; Ruckerl et al., 2006; Ruckerl et al., 2007; Künzli et al., 2005). Die Studien weisen auf die systemische Entzündung mit Aktivierung der Gerinnungskaskade als grundlegenden, initialen über das Blut wirkenden Weg hin, der zu der Assoziation „Feinstaubbelastung und kardiovaskuläre Erkrankungen“ beiträgt. Gerade der Einfluss der ultrafeinen Partikel, d.h. der Teilchengroßenbereich mit einem aerodynamischen

Durchmesser  $\varnothing < 100$  nm des Feinstaubes, wird mit der Entstehung und dem Fortschreiten von Entzündungsreaktionen und kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (Seaton et al., 1995; Pope et al., 2004b). Verglichen mit den feinen Partikeln ( $PM_{2,5} < 2,5 \mu m$ ) besitzen die ultrafeinen Partikel ( $PM_{0,1}$ ,  $\varnothing < 0,1 \mu m$ ) bei gleicher Massenkonzentration eine größere pulmonale Depositionseffizienz (Chalupa et al., 2004; Daigle et al., 2003). Sie induzieren bei gleicher Massenkonzentration, aufgrund ihrer höheren Anzahl sowie größeren Oberfläche und der damit meist verbundenen erhöhten oxidativen Kapazität, eine stärkere Entzündungsreaktion in der Lunge (Brown et al., 2001; Li et al., 1999; Li et al., 2003; Oberdörster et al., 1995). In der Studie von Stoeger und Mitarbeitern (2006) konnte gezeigt werden, dass die Partikeloberfläche der biologisch relevante Parameter für die Entzündungsreaktion ist. Der aus der Partikel-Zell-Interaktion resultierende oxidative Stress, verursacht durch in der Zelle freigesetzte reaktive Sauerstoffspezies, gilt als initialer Verursacher der Entzündungsreaktion in der Lunge (Tao et al., 2003).

Darüber hinaus sind ultrafeine Partikel in der Lage, die epitheliale Barriere zu überwinden und nicht nur in das Interstitium (= Zwischenräume der Organe) (Geiser et al., 2005), sondern auch in die systemische Blutzirkulation zu gelangen (Nemmar et al., 2002a; Oberdörster et al., 2002; Mills et al., 2006). Damit werden die ultrafeinen Partikel über das Blut zu den sekundären Zielorganen wie zum Beispiel Herz, Aorta und Leber transportiert (Takenaka et al., 2001; Kreyling et al., 2002; Semmler et al., 2004; Elder et al., 2006).

Auf der Basis dieser Befunde wurden verschiedene Hypothesen aufgestellt, um zu erklären, wie inhalierte ultrafeine Partikel auf das kardiovaskuläre System wirken (Pope et al., 2004a; Brook et al., 2004). Die traditionelle Sichtweise ist, dass nach der Inhalation die deponierten Partikel oxidativen Stress erzeugen, eine Entzündungsreaktion in der Lunge auslösen und „indirekt“ ihren Einfluss über die Freisetzung pro-entzündlicher und/oder pro-thrombotischer Mediatoren in die Blutzirkulation bewirken (Seaton et al., 1995). Demgegenüber weisen toxikologische Studien der letzten Jahre darauf hin, dass gerade die inhalierten unlöslichen ultrafeinen Partikel imstande sind, schnell in die Blutzirkulation zu translozieren (Mills et al., 2006; Kreyling et al., 2002) und ein großes Potenzial besitzen, „direkte“ Effekte auf die Hämostase (Blutstillung, Stypsis) oder kardiovaskuläre Integrität auszuüben (Nemmar et al., 2001; Nemmar et al., 2002b, Khandoga et al., 2004, Radomski et al., 2005).

Während die traditionelle Hypothese einen „indirekten“ Wirkungsweg über das Blut auf das kardiovaskuläre System beschreibt, wobei die ultrafeinen Partikel (UfP) zunächst eine lokale (pulmonale) Reaktion auslösen, die die systemischen Effekte verursachen sollen, postuliert die revidierte Hypothese einen „direkten“ Wirkungsweg, bei dem die Lungen für die UfP nur



als effiziente Eingangspforte in die Blutzirkulation dienen, durch die Sie in verschiedene Organe transportiert werden. Die systemischen Effekte werden somit durch das Vorkommen von UfP in extrapulmonalen Organen verursacht. Die revidierte Hypothese wird durch die Studie von Nurkiewicz und Mitarbeiter (2005) unterstützt, die feststellen konnten, dass nach der Exposition von Ratten mit ROFA (*residual oil flash*) oder TiO<sub>2</sub> die systemische mikrovaskuläre Reaktion unabhängig von dem Ausmaß der pulmonalen Entzündungsreaktion ist. Hinweise auf „direkte“ thrombotische Prozesse durch ultrafeine Kohlenstoffpartikel (UfCP) konnte ebenfalls die toxikologische Studie aufzeigen, die in Kooperation mit dem Institut für chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) (Prof. F. Krombach) durchgeführt wurde (Khandoga et al., 2004). Dabei wurden ultrafeine Kohlenstoffpartikel intraarteriell infundiert, d.h. „direkt“ systemisch verabreicht. Diese verursachten eine signifikant erhöhte Thrombozytenakkumulation an der Endotheloberfläche von hepatischen kapillaren Blutgefäßen von gesunden Mäusen, sowie eine prothrombotische Reaktion, die mit einer erhöhten Deposition des von-Willebrand-Faktors einher ging (Khandoga et al., 2004). Dennoch gibt es ebenso Evidenz für die traditionelle Hypothese, nämlich die des „indirekten“ Wirkungsweges (Seaton et al., 1995). Beispielhaft hierfür wären die kontrollierten Humanstudien von Salvi und Mitarbeitern (1999; 2000) zu nennen, die nach der Inhalation von DEP (*diesel exhaust particles*) eine pulmonale Entzündungsreaktion feststellten, die aufgrund erhöhter Leukozyten- und Thrombozytenzellzahlen im Blut mit einer systemischen Entzündungsreaktion assoziiert wurde. Die Frage, ob die extrapulmonalen Effekte eine „direkte“ oder „indirekte“ Wirkung der Inhalation von Feinstaub sind, blieb bislang noch offen. Es gibt derzeit keine Information darüber, ob diese „direkten“ systemischen Effekte nach einer Partikelinhalation existieren und wenn ja, welche der verschiedenen systemischen Reaktionen tatsächlich davon betroffen sind.

Es ist daher von großem Interesse zu klären, ob UfCP „direkt“ durch Translokation die Blutzirkulation erreichen oder „indirekt“ über die Freisetzung von Mediatoren aus der Lunge in das Blut die Blutzellen oder die Zellen von extrapulmonalen Organen wie Herz, Aorta und Leber beeinflussen.

Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, diese Fragestellung experimentell zu bearbeiten. Es sollte zum einen die Hypothese des „indirekten“ partikulären Wirkungsweges von der Lunge zu den extrapulmonalen Zielorganen mittels Entzündungsmediatoren geprüft werden. Dies wurde durch eine inhalative Exposition mit UfCP (kohlenstoffhaltige Partikel dominieren in den Umweltpartikeln) von BALB/cJ Mäusen und anschließender Analyse der entzündlichen Reaktionen in der Lunge sowie in den sekundären Organen (Blut, Herz, Aorta und Leber)

erzielt. Um die Hypothese der „direkten“ systemischen partikulären Wirkung – durch Translokation – für den Inhalationsweg zu überprüfen, wurde zum anderen eine intraarterielle Infusion von UfCP in die Halsschlagader (*Arteria carotis*) von BALB/cJ Mäusen durchgeführt. Damit wurde die direkte systemische Wirkung der Partikel über die Blutzirkulation auf die extrapulmonalen Organe untersucht, wobei die infundierten Partikel die durch die Lunge gewanderten Partikel (Translokation) simulieren.

Durch eine vergleichende Analyse der ausgewählten Endpunkte (Partikeleffekte) der Expositionsmoden „Ganzkörperinhalation“ und „intraarterielle Infusion“ am Mausmodell sollte nun zwischen „direkten“ systemischen Partikeleffekten und/oder über Entzündungsmediatoren aus der Lunge vermittelten systemischen Effekten unterschieden werden, um damit den schon genannten potenziellen Einfluss der translozierten UfCP für den Inhalationsweg zu bestimmen.

Die initialen, extrapulmonalen und (mikro-)vaskulären Effekte wurden mittels pro-entzündlicher, endothelaktivierender und pro-koagulatorischer Marker in Lunge, Blut, Herz, Aorta und Leber untersucht. Dies sollte als Indikator für die akuten, entzündlichen und prothrombotischen Wirkungsmechanismen der systemischen kardiovaskulären Partikelwirkung gelten. Hämatologische und durchflusszytometrische Untersuchungen von extrazellulären Aktivierungsmarkern auf Monozyten und Granulozyten, d.h. relevante Zellen der angeborenen Immunität während der akuten systemischen Entzündungsreaktion, müssten dabei den Aktivierungszustand der zirkulierenden Zellen aufzeigen. Im Vordergrund der untersuchten Wirkungswege „oxidativer Stress – Leukozyten (Akkumulation) – Epithel-/Endothelaktivierung mit Gerinnung/Koagulation“ der Gen- und Proteinexpressionsanalyse stand das Gesamtmuster der Effekte von funktionell gruppierten Markern und weniger der einzelne Effekt eines Markers. Zusammenfassend können die Ziele und die experimentellen Ansätze der vorliegenden Dissertationsarbeit wie folgt formuliert werden:

1. Evaluierung des „indirekten“ partikulären Wirkungsweges durch Entzündungsmediatoren.  
Kurzzeit-Inhalationsexperiment mit UfCP in umweltrelevanter Dosis (10-fach höher) am jungen und gesunden Mausmodell.  
Untersuchung partikelspezifischer, kardiovaskulärer Wirkungsmechanismen hinsichtlich Entzündung, Endothelaktivierung und prothrombotischen Reaktionen in extrapulmonalen Organen.
2. Evaluierung des „direkten“ partikulären Wirkungsweges mittels der intraarteriellen Infusion von UfCP.

Durchführung der intraarteriellen Infusion von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln am Mausmodell nach der Methode von Khandoga und Mitarbeiter (2004) und anschließende Untersuchung der „direkten“ systemischen Partikeleffekte mit den Endpunkten aus der Inhalationsstudie.

3. Vergleich extrapulmonaler Effekte nach Inhalation und Infusion von UfCP. Ermittlung des Beitrags der Lungenentzündung und/oder der translozierten UfCP auf die Effekte in extrapulmonalen Organen.

## **2 Literaturreview**

### **2.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen**

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den weltweit häufigsten Todesursachen und sind verantwortlich für fast 30 % aller Todesfälle (Guilbert, 2003). Als Todesursachen sind hier Herzrhythmusstörungen, Herzinfarkte oder Herzversagen zu nennen. Zu den klassischen, „traditionellen“ Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen gehören der Tabakkonsum, ein hoher Blutdruck, ein erhöhter Blutzuckerspiegel und hohe LDL(low density lipoprotein)- und HDL(high density lipoprotein)-Cholesterinkonzentrationen im Blut (Elisaf et al., 2001; Yusuf et al., 2001). Durch einen erhöhten LDL-Cholesterinspiegel im Blut kommt es zu Ablagerungen von Cholesterin in den Arterienwänden, die zur Artherosklerose und letztlich durch Plaquerupturen und anschließend entstehende Thrombosen zu einem Herzinfarkt führen können. Gerade die Feinstaubexposition wird in zahlreichen Studien mit diesen Erkrankungen, die das Herz- und Gefäßsystem des Körpers betreffen, assoziiert. Die akute Entzündungsreaktion, die systemische Endothelaktivierung sowie deren Dysfunktion werden als initiale Verursacher für das kardiovaskuläre Erkrankungsbild angesehen (Delfino et al., 2005).

### **2.2 Gesundheitseffekte durch Feinstaub?**

In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde die Exposition von Umweltstäuben mit einer erhöhten pulmonalen und kardiovaskulären Morbidität und Mortalität in Zusammenhang gebracht (Delfino et al., 2005). Epidemiologische Studien beschäftigen sich mit den Ursachen und Folgen sowie der Verbreitung von gesundheitsbezogenen Zuständen und Ereignissen in Populationen. Die Epidemiologische Studien untersuchen somit jene Faktoren wie zum Beispiel erhöhte PM-Konzentrationen in der Umwelt, die zu Gesundheit und Krankheit von Individuen und Populationen beitragen und sind deshalb die Basis aller Maßnahmen, die im Interesse der Volksgesundheit unternommen werden. Gerade bei Menschen mit einer Vorschädigung des respiratorischen bzw. kardiovaskulären Systems belegen die epidemiologischen sowie toxikologischen Studien den gesundheitsgefährdenden Effekt der Feinstaubbelastung auf den Organismus. Besonders die Befunde kontrollierter klinischer und experimenteller Studien tragen zu dem besseren Verständnis bei, die Mechanismen zu identifizieren, die die kardiovaskulären Effekte verursachen. Während die zahlreichen Studien zwar zeigen können, dass die PM-Exposition mit kardiovaskulären Effekten assoziiert werden kann, spiegeln die Befunde der Studien noch immer ein nur fragmentäres und zurzeit unschlüssiges Bild der betei-

lichten komplexen biologischen Wirkungswege wieder.

Im Folgenden werden zum einen die Befunde epidemiologischer Studien und zum anderen die Befunde von ausgewählten toxikologischen Studien beschrieben, wobei jeweils die pulmonalen und kardiovaskulären Befunde getrennt angesprochen werden. Anschließend werden die daraus ableitbaren partikelspezifischen Pathomechanismen angesprochen, deren Gesamtbild sehr komplex ist. Hierbei werden die Schwerpunkte auf die PM-vermittelte zelluläre Stressreaktion, auf die pulmonale und die systemische Entzündungsreaktion mit systemischer Endothelaktivierung/-dysfunktion und auf den gerinnungsfördernden Status gelegt, welche in der vorliegenden Arbeit Hauptgegenstand der Untersuchung sind. Anschließend wird die Ursache der systemischen Befunde erörtert. Im Vordergrund stehen hier die Hypothesen der Translokation von UfP durch die Lunge oder der freigesetzten Mediatoren, die in die Blutzirkulation gelangen und die kardiovaskulären Negativ-Effekte verursachen. Abschließend werde ich auf die Feinstaubcharakteristika eingehen.

### **2.2.1 Epidemiologische Befunde**

Generell möchte man mit epidemiologischen Studien den Zusammenhang zwischen der Exposition von PM und einer Erkrankung ermitteln. Ein gesundheitlicher Risikofaktor kann etwa die Inhalation von Umweltstäuben sein, welches eine Erkrankungswahrscheinlichkeit erhöht. Epidemiologische Studien analysieren beispielsweise innerhalb eines definierten Zeitraums Daten von Umweltparametern wie z.B. die Anzahl- oder die Massenkonzentration von Partikeln in der Umwelt sowie Daten von Gesundheitsparametern einer Bevölkerungsgruppe, die in klinischen Untersuchungen erhoben werden. Die statistische Analyse ermöglicht dabei eine Assoziation der zeitlich auftretenden Gesundheitseffekte innerhalb einer Bevölkerungsgruppe mit der beispielsweise erhöhten PM-Konzentration in der Umwelt z.B. aufgrund einer schon bekannten Umweltverschmutzungsperiode.

#### **2.2.1.1 Feinstaubbelastung und Mortalität**

Epidemiologische Studien, die die negativen Gesundheitseffekte durch die PM Exposition zum Thema haben, assoziieren mit PM eine erhöhte pulmonale und kardiovaskuläre Sterblichkeit. Zu der bedeutendsten Studie gehört die Harvard Six City Study (Dockery et al., 1993). Die Mortalitätsrate lag bis zu 26 % höher in starker - mit einer um  $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$  bzw.  $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$  erhöhten  $\text{PM}_{10}$ - bzw.  $\text{PM}_{2,5}$ -Belastung - belasteten Gebieten. Damit zeigte die Studie für die feine Partikelfraktion ( $\text{PM}_{2,5}$ ) eine stärkere Assoziation hinsichtlich der Mortalität im

Vergleich zu PM<sub>10</sub>. Darüber hinaus gehörten in dieser Studie kardiovaskuläre Todesursachen zur größten Einzelkategorie aller Verstorbenen. Metaanalysen epidemiologischer Studien belegen, dass die Mortalität bei einem akuten Anstieg der Feinstaubmassenbelastung um 10 µg/m<sup>3</sup> PM<sub>10</sub> im Mittel um 0,6 % ansteigt. Ursächlich hierfür ist ein Anstieg der Mortalität aufgrund von Lungenerkrankungen um 1,3 % und aufgrund von Herz-Kreislauf-Erkrankungen um 0,9 % (Guilbert, 2003). Der prozentuale Anstieg der Mortalität durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist zwar geringer als der durch Lungenerkrankungen, jedoch ist die kardiovaskuläre Morbidität für die Bevölkerung von größerer Bedeutung, da deren Anzahl die pulmonale Morbidität deutlich übersteigt (Schulz, 2006).

### **2.2.1.2 Feinstaubbelastung und Morbidität**

Die beobachteten gesundheitlichen Beeinträchtigungen (Morbidität) lassen sich insgesamt gesehen in eine lokale Wirkung auf die Lunge und in systemische Wirkungen unterteilen.

#### **2.2.1.2.1 Pulmonale Befunde**

In einer großen Zahl amerikanischer, europäischer und deutscher Querschnittsstudien zeigte sich eine signifikante Assoziation von Atemwegssymptomen und Einschränkungen der Lungenfunktion mit der partikulären Luftschadstoffbelastung (PM<sub>10</sub> und PM<sub>2,5</sub>). Es wird ein vermindertes Lungenwachstum und eine eingeschränkte Lungenfunktion (Jedrychowski et al., 1999; Gaudermann et al., 2004) sowie die Entstehung oder Verschlimmerung pulmonaler Entzündungsprozesse, vor allem bei Menschen mit einer Vorschädigung des respiratorischen Systems, wie zum Beispiel Asthma (Peters et al., 1997; von Klot et al., 2002), Bronchitis und chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) (Schikowski et al., 2005), festgestellt. Somit weisen einige Studien erstmals auf die nachteiligen Gesundheitseffekte verursacht durch die ultrafeinen Partikel hin (Peters et al., 1997).

#### **2.2.1.2.2 Kardiovaskuläre Befunde**

Gerade in den letzten Jahren hat sich der Fokus der wissenschaftlichen Aktivitäten zunehmend auf das Herz-Kreislauf-System als sogenanntes sekundäres Zielorgan verschoben, da Zusammenhänge der Feinstaubexposition mit Herzrhythmusstörungen, Herzinfarkten bzw. Herzversagen als Todesursache festgestellt wurden. Akute Folgen wurden insbesondere bei Patienten mit ischämischer Herzerkrankung (Schwartz et al., 1995), Herzrhythmusstörungen bzw. Arrhythmien (Peters et al., 2000) und Herzinsuffizienz (Morris et al., 1995) beobachtet.

Verschiedene Endpunkte, die in epidemiologischen Studien mit der Feinstaubbelastung assoziiert wurden, sind Herzfrequenzanstieg (Peters et al., 1999) bei eingeschränkter Herzfrequenzvariabilität (Gold et al., 2000, Devlin et al., 2003), arterielle Vasokonstriktion (Brook et al., 2002) mit Anstieg des arteriellen Blutdruckes (Ibald-Mulli et al., 2004), eine erhöhte Plasmaviskosität (Peters et al., 1997) sowie erhöhte Konzentrationen von Gerinnungsfaktoren und zahlreichen Markern für eine systemische Entzündungsreaktion (Danesh et al., 2000). Aus den zahlreichen gemessenen Endpunkten und den damit verknüpften komplexen Befunden epidemiologischer und toxikologischer Studien wird ein breites Spektrum an Effekten auf das kardiovaskuläre System mit der Feinstaubexposition abgeleitet (Tabelle 1).

Die molekularen Mechanismen, die zur Auslösung beziehungsweise Verschlechterung des systemischen kardiovaskulären Erkrankungsbildes führen, sind jedoch bislang weitgehend unbekannt. Epidemiologische Studien der letzten Jahre weisen auf die Inhalation von PM als Auslöser für die systemischen Entzündungsreaktionen und nachfolgenden Veränderungen in der kardiovaskulären Funktion durch eine endotheliale Dysfunktion und prothrombotische Prozesse, die mit der Progression von pathophysiologischen Erkrankungen assoziiert werden (Schwartz et al., 2001; Ruckerl et al., 2006; Ruckerl et al., 2007; Künzli et al., 2005), hin. Die Studien weisen auf die pulmonale und systemische Entzündung sowie Teile der Gerinnungskaskade als grundlegenden, initialen Wirkungsweg hin, der zu der Assoziation „Feinstaubbelastung und kardiovaskuläre Erkrankungen“ beiträgt.

Mit erhöhter Feinstaubexposition assoziierte Befunde	
Kardiovaskuläres System	
▶	Systemische Entzündungsreaktion
▶	Gerinnungsfördernder Status
▶	Endothelaktivierung und endotheliale Dysfunktion
▶	Progression artherosklerotischer Prozesse
▶	Störung des vegetativen Gleichgewichtes und der Gefäßmotorik
▶	Herzrhythmusstörungen
→	Herzinfarkt / Herzversagen

**Tabelle 1:** Mit erhöhter Feinstaubexposition assoziierte Befunde

#### **2.2.1.2.2.1 Systemische Entzündungsreaktion**

Epidemiologische Studien haben darauf hingewiesen, dass die Inhalation von Feinstaub die alveoläre lokale Entzündung und die systemische Entzündungsreaktion induziert. Dabei wurden in der Blutzirkulation erhöhte Interleukin-1 beta (IL-1 beta) und Interleukin-6 (IL-6) Zytokinkonzentrationen (van Eeden et al., 2001) und erhöhte Zellzahlen von neutrophilen

Granulozyten nach der Exposition von Umweltstäuben gemessen, die durch Waldbrände verursacht waren (Danesh et al., 2000). Als Ursache für die erhöhten Zellzahlen wird eine Rekrutierung der Leukozyten aus dem Knochenmark diskutiert (Danesh et al., 2000).

Für IL-1 beta und IL-6 in der Blutzirkulation ist bekannt, dass sie in der Leber die Akute-Phase-Reaktion, eine systemische entzündliche Abwehrreaktion des Organismus, einleiten. Die Zytokine IL-1 beta und IL-6 stimulieren, in Anwesenheit von Cortisol, die Leber zur vermehrten Synthese von verschiedenen Akute-Phase-Proteinen wie zum Beispiel Fibrinogen und C-reaktives Protein (CRP). Ein Anstieg von Fibrinogen und des C-reaktiven Proteins (CRP) als Marker für eine systemische Entzündungsreaktion, aber auch erhöhte Zellzahlen von Monozyten und Granulozyten in der Blutzirkulation, sind bislang nach der Exposition von PM gut belegt (Schwartz et al., 2001). Riediker und Mitarbeiter (2004) stellten 10-12 Stunden nach der PM-Exposition eine Assoziation zwischen einem PM<sub>2,5</sub>-Massenkonzentrationsanstieg von 10 µg/m<sup>3</sup> mit einer Zunahme von neutrophilen Granulozyten (6 %) und CRP (32 %) im Blut von gesunden Probanden fest. Die PM assoziierten Veränderungen sind hier allerdings nur moderat. Die beobachteten Veränderungen in Assoziation mit der PM<sub>10</sub>- und PM<sub>2,5</sub>-Exposition werden auch verstärkt bei Menschen mit einer Vorerkrankung wie der koronaren Herzkrankheit (CHD) festgestellt (Chen et al., 2005). Diese Personen weisen per se erhöhte Konzentrationen von Zytokinen im Blut und damit einen pro-entzündlichen, pro-koagulatorischen Status auf. Die Ergebnisse dieser und weiterer Studien legen nahe, dass die inhalierten Partikel akute Herzinfarkte auslösen können, die durch eine vorangegangene systemische Akute-Phase-Reaktion und einem gerinnungsfördernden Status induziert werden (Chen et al., 2005; Delfino et al., 2005).

#### **2.2.1.2.2.2 Gerinnungsfördernder Status**

Sowohl die Akute-Phase-Reaktion als auch die Aktivierung von Endothelzellen bei entzündlichen Prozessen führen zu einem verstärkten gerinnungsfördernden Status, der durch Komponenten der Gerinnungskaskade, ihrer regulatorischen Enzyme oder ihrer Degradationsprodukte gemessen werden kann (Utell et al., 2000; Riediker et al., 2004; Ruckerl et al., 2006). Der Faktor VII beispielsweise repräsentiert eines der Schlüsselenzyme der Gerinnungskaskade (extrinsisches System) und wird als Marker in epidemiologischen Studien verwendet. Die Ergebnisse in der Literatur hinsichtlich der Feinstaubbelastung und dem Faktor VII sind jedoch widersprüchlich und bleiben daher noch ungelöst (Pekkanen et al., 2000; Seaton et al., 1999). Eine Erklärung wäre die lokal abhängige, unterschiedliche Zusammensetzung von PM. Dennoch lässt sich aus einzelnen Studien schließen, dass die Exposition mit Umweltpartikeln mit



Veränderungen in der Balance zwischen koagulatorischen und fibrinolytischen Faktoren assoziierbar zu sein scheint, die besonders auch toxikologische Studien bestätigen.

#### **2.2.1.2.2.3 *Endothelaktivierung und endotheliale Dysfunktion***

Bei einer Entzündungsreaktion in der Lunge oder in extrapulmonalen Organen kommt es zur Endothelaktivierung. Eine Endothelaktivierung ist über die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen oder von Stressgenen und von der Sekretion von pro-entzündlichen Mediatoren charakterisiert. Sie kann auch als initiale(r) Phase/Vorgang angesehen werden, die/der zur endothelialen Dysfunktion führt. Die Endothelaktivierung sowie deren Dysfunktion spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese vieler kardiovaskulärer Erkrankungen (Vallet et al., 2003). Störungen der Endothelfunktion sind durch eine Abnahme des NO-Spiegels und einer daraus resultierenden Gefäßverengung und einer prokoagulatorischen Oberfläche charakterisiert (Ulrich et al., 2002). Es gibt bislang nur wenige klinische Studien, die Endpunkte zur Untersuchung einer Endothelaktivierung beziehungsweise einer endothelialen Dysfunktion durchgeführt haben und deren Ergebnisse konsistent sind. Hauptsächlich neuere Studien verwenden entsprechende Marker in ihren Untersuchungen. Die epidemiologische Studie von Ruckerl und Mitarbeiter (2006) schließt in ihren Untersuchungen an koronarer Herzkrankheit (CHD) erkrankter Patienten, zusätzlich zu Akute-Phase- und thrombotischen Markern, Marker wie ICAM-1 und E-Selektin (Adhäsionsmoleküle) für eine Endothelaktivierung und vWF (von-Willebrand-Faktor) als Anzeichen einer endothelialen Dysfunktion mit ein. Mit Ausnahme von E-Selektin wurden für diese Marker positive Assoziationen mit der PM<sub>2,5</sub> und PM<sub>0,1</sub>-Exposition gefunden. Es ließen sich die Effekte nicht eindeutig zu den einzelnen untersuchten Fraktionen des Umweltaerosols zuordnen, jedoch zeigte diese Studie gesamtheitlich eine eindeutige Assoziation von PM mit einer Endothelaktivierung und Dysfunktion des kardiovaskulären Systems.

#### **2.2.1.2.2.4 *Progression artherosklerotischer Prozesse***

Zur Entstehung der Artherosklerose existieren mehrere Theorien, deren Ausgangspunkt die endotheliale Dysfunktion ist. Der Verlust der Stickstoffmonoxid (NO) vermittelten Gefäßerweiterung ist das Kennzeichen einer endothelialen Dysfunktion, die bereits in der Frühphase der Atherosklerose nachweisbar und ursächlich mit dieser Erkrankung verbunden ist (Simon et al. 1999). In diesem Zusammenhang ist eine Studie hervorzuheben, die ihren Fokus auf die Wirkung von Feinstaub bei der Entstehung und Progression artherosklerotischer Prozesse gelegt hat. Der epidemiologische Ansatz von Künzli und Mitarbeiter (2005) stützt sich auf die

sonographische Messung der Intima-Media-Dicke der *Arteria carotis communis* als Marker für subklinische artherosklerotische Veränderungen und deren Assoziation zur PM<sub>2,5</sub>-Belastung. Die Intima (*Tunica intima*) sowie die Media (*Tunica media*) sind die innersten Schichten der Gefäßwand der Arterien. Gerade in diesen Schichten finden artherosklerotischen Prozesse statt, die zu einer Verdickung bzw Sklerotisierung führen (siehe auch 2.3.2.4, Seite 27). Unter Berücksichtigung von verschiedenen Kovariablen wurde eine durchschnittliche Zunahme der Intima-Media-Dicke um 4 % für eine Expositionsdifferenz von 10 µg/m<sup>3</sup> PM<sub>2,5</sub> abgeschätzt. Besonders deutliche Effekte fanden sich bei Personen über 60 Jahren, hier wurde die stärkste Assoziation gefunden (15,7 %).

#### **2.2.1.2.2.5 Störung des vegetativen Nervensystems und der Gefäßmotorik**

Eine Veränderung der autonomen Regulation bzw. des vegetativen Gleichgewichtes macht sich in der Herzschlagfrequenz (HR), in der Variabilität der Herzschlagfrequenz (HRV) sowie in einer Änderung des Blutdrucks bemerkbar. Diese Parameter sind bekannte Risikofaktoren für kardiale Ereignisse wie beispielsweise eines Herzinfarktes. Aus diesem Grunde wird der Einfluss von Partikeln auf diese Parameter untersucht, jedoch sind die dabei beobachteten Effekte allgemein sehr geringfügig. Eine erhöhte Herzfrequenz (Tachykardie) wird mit einer erhöhten partikulären Luftschadstoffbelastung assoziiert (Peters et al., 1999). Demgegenüber beobachteten Gold und Mitarbeiter (2000) eine Abnahme der Herzfrequenz (Bradykardie) in Assoziation mit PM<sub>2,5</sub> in einer Studie, in der allerdings nur ältere Personen berücksichtigt wurden. Die Studien zeigen hinsichtlich dieses Parameters inkonsistente Befunde.

Die Herzfrequenzvariabilität (HRV) gehört zu den am meisten verwendeten Parametern, um Effekte auf die autonome Kontrolle des Herzens zu bestimmen (Zareba et al., 2001). Mit der Feinstaubexposition wird eindeutig eine vom sympathischen Tonus abhängige Abnahme in der Herzfrequenzvariabilität (HRV) beobachtet, die vor allem bei älteren und gesundheitlich vorgeschädigten Menschen zu einem Herzinfarkt führen kann (Pope et al., 2004b; Brauer et al., 2001; Gold et al., 2000; Liao et al., 1999).

Ibald-Mulli und Mitarbeiter (2001) beobachteten einen signifikanten Anstieg des systolischen Blutdrucks von Probanden in Assoziation mit Konzentrationen von TSP (*total suspended particles*) am gleichen Tag sowie eine Erhöhung des 5-Tage-Durchschnittswertes. Mit einem TSP-Anstieg von 90 µg/m<sup>3</sup> wurde ein systolischer Blutdruckanstieg von 1,8 mm Hg in Personen, die eine hohe Plasmaviskosität oder erhöhte Herzschlagfrequenz aufwiesen, assoziiert. Ein Anstieg des sympathischen Tonus und/oder die Modulation des basalen systemischen vaskulären Tonus aufgrund von erhöhten Endothelin-1 Konzentrationen, die mit der PM-

Exposition assoziiert sind, wurden als mögliche Mechanismen für den beobachteten Blutdruckanstieg diskutiert. Jedoch konnten andere Studien diese Assoziationen nicht bestätigen, sie beobachteten sogar demgegenüber eine leichte Blutdruckabnahme (Brauer et al., 2001; Ibal-Mulli et al., 2004). Die gesamten Befunde hinsichtlich der Beeinflussung des Blutdrucks und der Herzfrequenz durch die Feinstaubexposition bleiben demnach noch inkonsistent.

#### **2.2.1.2.2.6 Herzrhythmusstörungen**

Der Schwerpunkt der Untersuchungen hinsichtlich der PM-Effekte lag bislang hauptsächlich auf der Messung von Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien) und weniger auf den physiologischen Ursachen die zu den myokardialen Fehlfunktionen führen. Peters und Mitarbeiter beobachteten, dass, in Assoziation mit einer  $PM_{2,5}$ -Konzentrationszunahme von  $22 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Odds Ratio von 1,64), Patienten ein erhöhtes Vorkommen von Herzrhythmusstörungen (z.B. Kammerflimmern) erfuhren. Dies wurde in 10 oder mehreren Interventionen von Defibrillatorentladungen festgestellt. Odds Ratio, auch Quoten- oder Chancenverhältnis genannt, ist eine statistische Maßzahl der Stärke eines Zusammenhangs von zwei Merkmalen. Das Quotenverhältnis wird häufig in der Epidemiologie und in der Medizin verwendet, um zu erfahren, wie stark ein vermuteter Risikofaktor mit einer bestimmten Erkrankung zusammenhängt. Pekkanen und Mitarbeiter (2002) analysierten die Elektrokardiogramm-Daten (EKG) von Personen mit ischämischer Herzkrankheit und stellten Depressionen der ST-Strecke in Assoziation mit feinen und ultrafeinen Partikeln fest. Die ST-Strecke zeigt den Beginn der Erregungsrückbildung der Herzkammern an. Eine Veränderung der ST-Strecke indiziert einen möglichen Sauerstoffmangel, der beispielsweise aufgrund einer Durchblutungsstörung (Ischämie) hervorgerufen wird. Pekkanen und Mitarbeiter (2002) detektierten nach 2 Tagen eine statistisch signifikante akute Erhöhung des ST-Depressionsrisikos bei körperlicher Anstrengung in Assoziation mit  $PM_{2,5}$  und mit  $PM_{0,1}$ . Dies wurde mit einer Odds Ratio von 2,84 je  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  Anstieg der  $PM_{2,5}$ -konzentration und mit einer Odds Ratio von 3,14 je 10.000 Partikel/ $\text{cm}^3$  Anstieg der  $PM_{0,1}$ -konzentration belegt. Die Beobachtung von Erregungsrückbildungsstörungen, die sich in den ST-Segmentdepressionen zeigten sowie das Auftreten von Herzrhythmusstörungen hatten die Frage nach der Induktion einer elektrischen Instabilität durch veränderte Ionenkanalfunktionen der Herzzellen aufgeworfen (Pekkanen et al., 2002). Diese Hypothese wird durch Befunde toxikologischer Studien unterstützt (Siehe 2.2.2.2.6).

Zusammenfassend zeigen diese epidemiologischen Studien eindeutig, dass die PM-Exposition mit kardiovaskulären Effekten assoziiert ist. Die Befunde sind zwar mit dem Auftreten einer systemischen Entzündungsreaktion und einer Veränderung der autonomen Herzkontrollfunktion relativ konsistent, jedoch sind die spezifischen Hinweise hinsichtlich der Endpunkte Endothelaktivierung und -dysfunktion, eines prothrombotischen Status und einer PM-abhängigen myokardialen Fehlfunktion bislang nur sehr spärlich und erfordern weitere Untersuchungen.

## **2.2.2 Experimentelle toxikologische Studien**

Die Befunde der epidemiologischen Studien werden im Allgemeinen von experimentellen toxikologischen Studien bestätigt, wobei die untersuchten Endpunkte sich zu denen der epidemiologischen Studien oft unterscheiden.

### **2.2.2.1 Pulmonale Befunde**

Eine Assoziation von Atemwegssymptomen wie Einschränkung der Lungenfunktion und entzündliche Prozesse sind mit der PM-Exposition gut belegt (Tao et al., 2003). In-vitro-Studien belegen nach der PM-Exposition induzierte zelluläre Effekte, wie zum Beispiel eine erhöhte Produktion von ROS (*reactive oxygen species*) oder die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Beck-Speier et al., 2005; Donaldson und Stone, 2003). In-vivo-Studien weisen auf eine Einschränkung der Lungenfunktion (Stenfors et al., 2004; Frampton et al., 2004) sowie pro-entzündliche Prozesse in der Lunge (Salvi et al., 1999; Salvi et al., 2000; Andre et al., 2006), vor allem bei allergisch bzw. asthmatisch vorerkrankten Individuen (Alessandrini et al., 2006; Frampton et al., 2004). Salvi und Mitarbeiter (1999) beobachteten in ihrer kontrollierten Humanstudie, dass die durch Partikel ausgelöste alveolare Entzündung eine Aktivierung von Epithelzellen und von Endothelzellen in der Lunge bewirkt und mit einer Rekrutierung von Leukozyten einhergeht. Immunhistochemische Untersuchungen von bronchialen Biopsien zeigten 1 Stunde nach der Exposition mit 300 µg/m<sup>3</sup> PM<sub>10</sub>-Dieselruß einen Anstieg von ICAM-1 (2-fach) und VCAM-1 (3-fach) Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen sowie einem Anstieg der entsprechenden Liganden auf Leukozyten. Die genannten Integrine ICAM-1 und VCAM-1 werden vornehmlich auf Endothelzellen exprimiert und vermitteln die Adhäsion von Leukozyten bei der Transmigration in das entzündete Gewebe. Zudem wurde in der Studie mittels immunhistochemischer Untersuchungen für neutrophile Granulozyten eine 4-fache Zunahme im Epithelium und eine 3-fache Zunahme in der Submucosa, sowie für T-

Lymphozyten eine 6-fache Zunahme im Epithelium und eine 4-fache Zunahme in der Submucosa festgestellt. In einer vergleichbaren Folgestudie wurde die Untersuchung von Zytokinen bzw. Chemokinen durchgeführt, die für die Infiltration von Leukozyten in das Lungengewebe relevant sind. Es konnte auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden, dass Lungenepithelzellen IL-8 und Gro-alpha synthetisieren. Die für die Exposition verwendete PM<sub>10</sub>-Konzentration ist mit Spitzenwerten an Kraftfahrzeug-Hauptverkehrsstraßen zu vergleichen und zeigt, dass eine einstündige Exposition mit DEP (*diesel exhaust particles*) eine pulmonale und systemische Entzündungsreaktion induzieren kann. Bezüglich der ultrafeinen Stäube gibt es nur eine Forschergruppe in den USA, die ultrafeine Kohlenstoffpartikel (UfCP) von Gesunden und Patienten mit leichtem Asthma über 2 Stunden inhalieren ließ. Lediglich bei sehr hohen Konzentrationen, die ca. 10- bis 100-fach über der üblichen Umweltbelastung liegen, zeigte sich eine sehr geringe Veränderung in der Lungenfunktion. Hinweise für Entzündungszeichen in den Atemwegen fanden sich hierbei nicht (Frampton et al., 2004; Pietropaoli et al., 2004). Die tierexperimentelle Studie von Andre und Mitarbeiter (2006) zeigte, dass bereits eine kurzzeitige Belastung mit ultrafeinen Partikeln des „Feinstaubs“ zu entzündlichen Veränderungen in der Lunge führt. Gesunde Mäuse wurden für 4 beziehungsweise für 24 Stunden ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln (UfCP) oder gefilterter Luft ausgesetzt. Die UfCP-Massenkonzentration nach 24 Stunden Exposition betrug 380 µg/m<sup>3</sup>. Diese Partikeldosis entsprach etwa der 10- bis 100-fachen Massenkonzentration die in belasteten Großstädten innerhalb eines Tages gemessen wird. Eine Expressionsanalyse der Gene in den partikelexponierten Lungen ergab, dass die durch Feinstaub verursachte Reaktion in zwei Phasen verläuft. Nach 4 Stunden Inhalation waren verstärkt *heat shock* Gene aktiv, die für sogenannte Hitzeschockproteine der Hsp70-Familie codieren. Dies sind Eiweißstoffe, die andere Proteine bei oxidativen Stress funktionsfähig halten. Demgegenüber waren nach 24 Stunden UfCP verschiedene Gene der Akute-Phase- und Entzündungsreaktion aktiv. Zu den Genen, die durch die Feinstaubpartikel aktiviert wurden, gehörten beispielsweise das Serum Amyloid A3, Lipocalin-2 (Lcn2), Interleukin-1 beta, Osteopontin (Opn) und Galectin-3 (Gal3). Diese moderate pro-entzündliche Reaktion spiegelte sich auch in der 1 %igen Zunahme von neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit wieder. Es ist daher denkbar, dass das Einatmen von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln zu einer Verschiebung der Immunbalance und zu einer Entzündungsreaktion führt, die wiederum Allergien auslöst. Feinstaub, z.B. Dieselruß, steht schon länger im Verdacht, allergisch bedingtes Asthma zu verschlimmern (Stenfors et al., 2004). Eine Studie von Francesca Alessandrini unterstützt diese Vermutung (Alessandrini et al., 2006). Mäuse, die erst ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln und dann einem Allergen

(Ovalbumin) ausgesetzt waren, zeigten einen Anstieg der Entzündungsmarker, eine erhöhte Schleimproduktion und sich verkrampfende Atemwege. Die umgekehrte Reihenfolge – wenn die Tiere zunächst mit dem Allergieauslöser und dann mit UfCP in Berührung kamen – verursachte dagegen nur eine mäßige Entzündungsreaktion.

Es ergibt sich somit eine Diskrepanz zwischen den in epidemiologischen Studien gefundenen Assoziationen zwischen der Massenkonzentration atmosphärischer Partikel und Mortalität und Morbidität und den geringen kausalen Effekten in den kontrollierten Kurzzeitstudien bei Gesunden oder Patienten mit leichtem Asthma. Dies könnte darauf hinweisen, dass die pulmonalen Effekte bei der kurzzeitigen Partikelbelastung (bis zu einem Tag) eher gering sind und sich erst nach längerer Expositionszeit nachteilig auswirken. Die Effekte sind bei besonders empfindlichen Personen wie Kindern, älteren und erkrankten Patienten mit Asthma und COPD, stärker ausgeprägt. Sehr wahrscheinlich spielt hierbei auch die individuelle chemische Zusammensetzung der Umweltpartikel mit zum Beispiel Metallen und/oder mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen eine wichtige Rolle für die Entstehung von negativen Gesundheitseffekten (Tao et al., 2003; Oberdörster et al., 2005). In Kapitel 2.5 auf Seite 32 wird darauf näher eingegangen.

## **2.2.2.2 Kardiiovaskuläre Befunde**

### **2.2.2.2.1 Systemische Entzündungsreaktion**

Kontrollierte human- sowie tierexperimentelle Studien bestätigen die Befunde der epidemiologischen Studien. Nach der Exposition von PM wurden erhöhte Granulozytenzellzahlen und erhöhte Fibrinogenkonzentrationen im Blut als Marker (Indikatoren) für eine systemische Akute-Phase-Reaktion detektiert (Salvi et al., 1999; Huang et al., 2003; Elder et al., 2004; Kodavanti et al., 2002). Weitere Studien zeigen, dass die systemische Akute-Phase-Reaktion, ausgehend von einer pulmonalen Entzündung, sich schon 6 Stunden nach der Partikelexposition und damit relativ schnell ereignet (Salvi et al., 1999; Elder et al., 2004).

### **2.2.2.2.2 Gerinnungsfördernder Status**

Die Hypothese eines PM-induzierten gerinnungs- und thrombosefördernden Status wird insbesondere zunehmend durch toxikologische Untersuchungen gestützt, bei denen bisher der Schwerpunkt auf die Wirkung ultrafeiner Partikel lag. Nemmar und Mitarbeiter (2003a) untersuchten den Effekt nach der intratrachealen Verabreichung (Instillation) einer DEP (*diesel exhaust particles*) Suspension hinsichtlich der Thrombusbildung, der Thrombozytenaggrega-

tion und der Gerinnungskaskade an einem Hamstermodell. Dabei induzierten die Partikel schon 1 Stunde nach der Verabreichung eine erhöhte Adenosindiphosphat-ausgelöste Thrombozytenaggregation in-vitro. Ebenso wurde eine progressive Verkürzung der Gefäßverschlusszeit und ein Anstieg in der kumulativen Masse an in-vivo gebildeten Thromben an Blutgefäßen beobachtet. Diese Ergebnisse deuten auf eine durch DEP verursachte Thrombozytenaktivierung hin. Um festzustellen, ob vaskuläre Effekte auch unabhängig von der Entzündungsreaktion in der Lunge direkt durch ultrafeine Partikel induzierbar sind, untersuchten Khandoga und Mitarbeiter (Khandoga et al., 2004) die Endothel-Leukozyten- bzw. Endothel-Thrombozyten-Interaktion im mikrovaskulären Gefäßbett der Leber nach direkter intraarterieller Applikation von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln in der Maus. Es wurden prothrombotische Effekte im Sinne einer dosisabhängigen Adhäsion von Thrombozyten - nicht jedoch Leukozyten - auf dem Endothel nachgewiesen, die mit einer endothelial vermittelten Fibrin(ogen)deposition und einer erhöhten Expression des von-Willebrand-Faktors (vWF) einhergingen. Die Plasma Fibrinogenkonzentration sowie die P-Selektin Expression auf Endothelzellen der Leber, Marker für entzündliche Veränderungen, waren jedoch nicht verändert. Jedoch wiesen weitere Untersuchungen auf eine Aktivierung von Thrombozyten und auf einen Anstieg der Fibrin(ogen)affinität des Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorkomplexes hin. Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptoren binden an Fibrinogen oder an den von-Willebrand-Faktor und führen so zu einer Vernetzung bzw. zu einer Adhäsion von Thrombozyten und somit zu einer gemeinsamen Endstrecke der Plättchenaggregation.

#### **2.2.2.2.3 Endothelaktivierung und endotheliale Dysfunktion**

Salvi und Mitarbeiter (1999) beobachteten in ihrer kontrollierten Humanstudie mit PM<sub>10</sub>-Dieselrußpartikeln, dass die durch Partikelinhalation ausgelöste alveolare Entzündung eine Aktivierung von Endothelzellen in der Lunge zur Folge hat (2.2.2.1). Tierexperimentelle Studien zeigen nach der PM-Exposition neben systemischen Entzündungsreaktionen einen Anstieg der Endothelin-1 Konzentration (Vincent et al., 2001; Ulrich et al., 2002). Diese Ergebnisse weisen auf vasokonstriktorische Effekte hin und bestätigen eine durch die PM-Exposition vermittelte endotheliale Dysfunktion. Die Studie von Sun und Mitarbeitern (2005), die ein Artherosklerose-Tiermodell für ihre PM<sub>2,5</sub>-Exposition benutzten, unterstützen die Hypothese, dass eine alterierte Endothelial-Gefäßmuskelzell-Interaktion für die gestörte Gefäßmotorik verantwortlich ist (Sun et al., 2005). In der Studie wurde gezeigt, dass mit der PM<sub>2,5</sub>-Exposition die vaskuläre Relaxation der Aorten nach Zugabe des endothelabhängigen Agonisten Acetylcholin abgeschwächt und umgekehrt eine durch Serotonin ausgelöste Vaso-

konstriktion verstärkt wurde. Die Autoren diskutieren diesen Befund mit einem erhöhten Vorkommen von ROS wie Superoxid in den Endothelzellen, welches eine Herabsetzung des bioverfügbaren NO zur Folge haben könnte.

#### **2.2.2.2.4 Progression artherosklerotischer Prozesse**

Die tierexperimentelle Studie von Sun und Mitarbeiter (2005) nutzte ein Atherosklerose-Tiermodell, Apolipoprotein-E-defiziente Mäuse, und exponierte die Tiere über ein halbes Jahr lang 6 Stunden täglich für 5 Tage pro Woche mit konzentrierter Umgebungsluft aus Tuxedo, NY. Die mittlere PM<sub>2.5</sub>-Konzentration betrug 85 µg/m<sup>3</sup>. Bei fettreicher Ernährung wurde in der PM<sub>2.5</sub>-Gruppe eine etwa zweifache statistisch signifikante Zunahme der Fläche atherosklerotischer Plaques in der Aorta beobachtet. Weitere Untersuchungsendpunkte zeigten eine gestörte Gefäßregulation sowie eine verstärkte entzündliche Reaktion bei erhöhtem oxidativem Stress, nachweislich durch die Induktion von iNOS (*inducible nitric oxide synthase*), in den atherosklerotischen Plaques von Feinstaub exponierten Tieren. Direkt intratracheal instillierter Umweltstaub aus Ottawa, Kanada (EHC-93) am Kaninchenmodell mit artherosklerotischem Phänotyp, konnte mit vergrößerten artherosklerotischen Läsionen, einer erhöhten Plaque-Zellbildung und mit einem erhöhten Lipidgehalt in den Läsionen der Aorten assoziiert werden (Suwa et al., 2002a). Gerade diese Studie, in der die Analyse der Wirkung der Feinstaubbelastung zur Identifikation pathophysiologischer Prozesse führen kann, zeigt den notwendigen Weg zukünftiger Forschung auf diesem Gebiet.

#### **2.2.2.2.5 Störung des vegetativen Nervensystems und der Gefäßmotorik**

Die in epidemiologischen Studien beobachteten partikelassoziierten Effekte auf die Parameter Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität sowie Blutdruck sind sehr moderat (Kunzli et al., 2005; Peters et al., 2005; Schwartz et al., 2005) und lassen sich tierexperimentell am gesunden wie am kardiovaskulär erkrankten Tier bei UfP-konzentrationen im Spitzenbereich (180 µg/m<sup>3</sup> für 24 Std.) nachweisen (Harder et al., 2005). Dabei zeigen gesunde und gesundheitlich vorgeschädigte Tiere bei dem gleichen Expositionsmodus ein unterschiedliches Reaktionsmuster. Gesunde Organismen reagieren während der Exposition mit einem Herzfrequenzanstieg und zeigen keine Blutdruckveränderung. Hingegen erfolgt bei kranken Tieren, einjährigen spontan hypertensiven Ratten, eine Reaktionsverzögerung auf den 1. bis 3. Tag der Erholungsphase. Bei diesen Tieren ist neben einem Herzfrequenzanstieg und einer Abnahme der Herzfrequenzvariabilität auch ein Blutdruckanstieg nachweisbar, wobei dieser mit einer verminderten Vasodilatation (Vasokonstriktion) assoziiert wird. Die Ergebnisse der Stu-



die zeigen, dass es vor allem am erkrankten Organismus durch die Staubexposition zu einer Veränderung des kardialen autonomen Gleichgewichtes kommt, möglicherweise verursacht durch pulmonale Reflexe, die sich auf eine erhöhte sympathische Aktivität auswirken. Die Studie von Bartoli und Mitarbeitern (2008) unterstützt diese Hypothese. Eine experimentelle Blockade der  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren führte zur Unterdrückung der beobachteten Effekte eines erhöhten systolischen und diastolischen Blutdrucks als auch zu einer erhöhten Herzfrequenz von Hunden nach der Exposition von CAP (*concentrated ambient particles*).

#### **2.2.2.2.6 Herzhhythmusstörungen**

Nadziejko und Mitarbeiter (2004) führten eine kontrollierte Studie an gealterten Ratten mit 160 und 200  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  CAP durch. Eine 4-stündige Exposition führte zu einer deutlich erhöhten Inzidenz von Herzhhythmusstörungen, wobei eine weitere Untersuchung z.B. auf ventrikuläre Extrasystolen hin zwar entsprechende Tendenzen, jedoch keine signifikanten Änderungen erbrachte. Als ein möglicher Mechanismus kann eine elektrische Instabilität als Folge einer veränderten Ionenkanalfunktion angesehen werden. So konnten Graff und Mitarbeiter (2004) nach 24-stündiger Exposition von Herzmuskelzellen mit Zink eine Abnahme der spontanen Schlagfrequenz sowie Veränderungen in der Genexpression von *Gap-Junction*-, Kalium- und Calcium-Kanal-Proteinen nachweisen. Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration und eine Abnahme der Kontraktilität wurden in-vitro an isolierten Herzmuskelzellen nach Exposition mit ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln, Cadmium oder Nickel beobachtet (Schulz et al., 2005). Ob derartige Prozesse auch in-vivo nachweisbar sind, kann beim derzeitigen Wissensstand jedoch nicht beantwortet werden.

Epidemiologische und toxikologische Studien müssen zur Beurteilung der PM-Gesundheitseffekte zusammenfassend beurteilt werden. Dies geschieht in dem Sinne, dass die toxikologischen Studien vor allem bei hohen PM-Belastungen kurzfristige Effekte beurteilen und damit mögliche Mechanismen aufzeigen, während epidemiologische Studien den Einfluss auf die Gesamtpopulation unter den gegebenen Umweltbedingungen erfassen. Bei unseren aktuell vorliegenden Umweltbelastungen muss man davon ausgehen, dass feinstaubinduzierte Reaktionen insbesondere beim gesunden Organismus auf einem sehr geringen, schwer nachweisbarem Niveau ablaufen und die Wirkung bei chronischer Belastung akkumuliert. Eindeutig nachweisbare Effekte kommen wahrscheinlich erst nach jahrelanger Feinstaubexposition und mit großer Wahrscheinlichkeit überwiegend bei gleichzeitigem Vorliegen weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren zum Tragen. Während die zahlreichen Studien zwar zeigen kön-

nen, dass die PM-Exposition mit kardiovaskulären Effekten assoziiert werden kann, spiegeln die Befunde der Studien jedoch nur ein fragmentäres und zurzeit unschlüssiges Bild der involvierten komplexen biologischen Mechanismen (*pathways*) wieder. Die verfügbaren Daten zeigen zwar eine Konsistenz mit dem Auftreten einer systemischen Entzündungsreaktion und einer Veränderung der autonomen Herzkontrollfunktion, jedoch sind die Hinweise auf eine endotheliale Dysfunktion, auf einen gerinnungsfördernden Status und auf eine PM-abhängige myokardiale Fehlfunktion bislang nur sehr spärlich.

## 2.3 Pathophysiologische Wirkungen

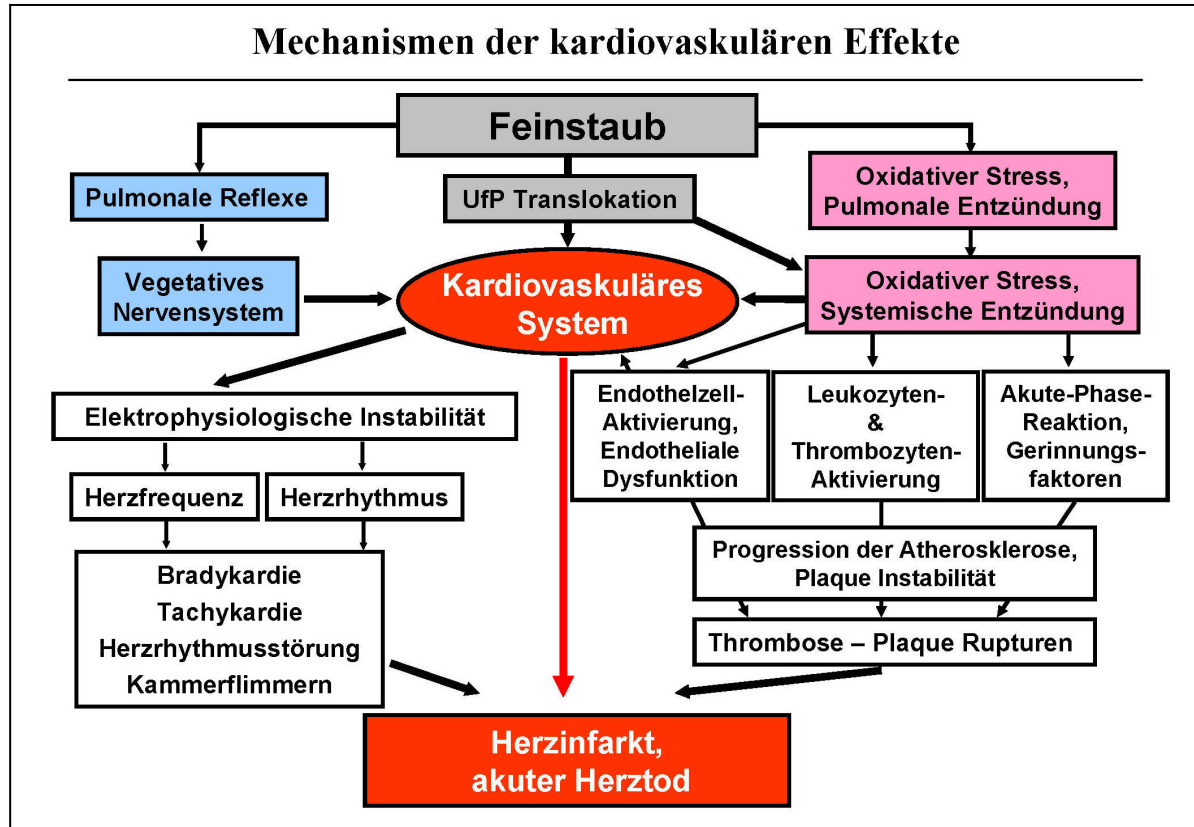
Aus epidemiologischen und toxikologischen Befunden wird ein breites Spektrum an Effekten auf das kardiovaskuläre System mit der Feinstaubexposition assoziiert (Tabelle 1, Seite 9). Die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen werden zurzeit erst ansatzweise verstanden. Trotz variierender und zum Teil widersprüchlicher Ergebnisse epidemiologischer und toxikologischer Studien - die vermutlich auf die jeweils unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften des untersuchten Feinstaubes zurückzuführen sind - ergibt sich ein pathophysiologisches Modell, das in Abbildung 1 zusammengefasst ist.

Fasst man den derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand zusammen, so werden die kardiovaskulären Wirkungen nach der Feinstaubexposition folgend vermittelt:

(1) Durch den Einfluss auf das vegetative Nervensystem. Die Entzündungsreaktion in der Lunge sowie rezeptorvermittelte pulmonale Reflexe führen zur Störung des vegetativen Gleichgewichtes wodurch die Herzfunktion beeinflusst wird. (2) Durch die direkte Wirkung der Partikel bzw. der Lösung von Metallsalzen nach der Translokation (durch die Lunge in die Blutzirkulation). Die Wechselwirkung der Partikel mit den systemischen Zielzellen löst dort oxidativen Stress und eine Entzündungsreaktion aus. (3) Durch die Entzündungsreaktion auf systemischer Ebene. Der erhöhte oxidative Stress sowie die Entzündungsreaktion in der Lunge vermitteln über die Freisetzung von Entzündungsmediatoren in das Blut die systemische Entzündungsreaktion. Dabei wird die Akute-Phase-Reaktion eingeleitet und es entsteht ein gerinnungsfördernder Status mit endothelialer Dysfunktion und Verstärkung atherosklerotischer Prozesse. Letztere Prozesse können zu Plaque Rupturen führen, die meist Thrombosen bzw. Ischämien zur Folge haben.

Zahlreiche ineinandergreifende Prozesse der endothelialen Dysfunktion, eines entzündungs- und gerinnungsfördernden Status, sowie der Ischämie (Minderdurchblutung) und einer veränderten Ionenkanalfunktion der Herzzellen, die eine elektrophysiologische Instabilität und ein verstärktes Auftreten von Herzrhythmusstörungen zu Folge hat, führen zu einer Beeinflus-

sung der Herzfunktion und letztlich zu dem fatalen akuten Herztod. In den nachfolgenden Kapiteln werden diese Mechanismen ausführlicher beschrieben.



**Abbildung 1: Mechanismen der Feinstaub-assoziierten kardiovaskulären Wirkung (Schulz et al., 2005).**  
 (1) Wirkung von UfP über das vegetative Nervensystem (hellblau), (2) Translokation und „direkte“ Wirkung von UfP (hellgrau), (3) Systemische Entzündungsreaktion durch „indirekte“ Wirkung von UfP (rosa), Herz und Gefäßsystem (rot)

### 2.3.1 Pulmonale Mechanismen

Allgemein stellen inhalierbare Partikel ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für die Lunge bzw. den gesamten Organismus dar. Voraussetzung für die partikuläre Wirkung auf den Organismus ist deren Deposition in der Lunge. Die potenzielle Wirkung von inhalierbaren Partikeln in den Alveolen hängt von deren Größe (Dimension), deren Beständigkeit (Löslichkeit), dem Depositionsverhalten in der Lunge und den *Clearance*-Mechanismen der Lunge ab (Oberdörster et al., 2005).

### 2.3.1.1 Oxidativer Stress

Der aus der Partikel-Zellinteraktion resultierende oxidative Stress gilt als initialer Verursacher der Entzündungsreaktion in der Lunge (Donaldson und Stone, 2003; Donaldson et al., 2005). Man geht derzeit davon aus, dass der partikulär verursachte oxidative Stress in der Zelle durch exogene und/oder endogene Faktoren beeinflusst wird. Die Partikeloberfläche sowie deren Komponenten wie z.B. Metalle können einerseits zur exogenen Generierung von ROS (reactive oxygen species) durch den Ablauf der Fenton-Reaktion beitragen. Die Fenton-Reaktion ist eine durch Eisensalze katalysierte Oxidation organischer Substrate mit Wasserstoffperoxid in saurem Medium. Sie wird in biologischen Systemen als Hauptquelle von ROS in der Zelle gesehen, was wiederum zu oxidativem Stress führt. Demgegenüber wird auch bei der zellulären Aufnahme von Partikeln über Phagozytose die Bildung von ROS beobachtet. Hinsichtlich der Partikel-Zellinteraktion stehen beide Mechanismen zur Diskussion. Gegen potenziell schädliche Substanzen wie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen (ROS/RNS) wurden im Verlauf der Evolution Schutzmechanismen entwickelt, die in der Zelle ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen aufrecht-erhalten. Wenn dieses Gleichgewicht gestört ist oder die antioxidativen Mechanismen (z.B. Glutathion, Vitamin C) eingeschränkt sind, spricht man vom "oxidativen Stress". Zu dem antioxidativ wirkenden System zählen beispielsweise antioxidative Enzyme wie z.B. Superoxiddismutase (SOD), Katalase,  $\gamma$ -Glutamyl-Cysteinyl-Synthetase, Hämoxigenase-1 oder nicht-enzymatische Antioxidantien wie z.B. Glutathion (GSH) des GSH/GSSG-Redoxsystems. Gerade diese Moleküle werden oft als diagnostische Marker für oxidativen Stress verwendet. Das Übermaß an ROS kann die Zelle irreversibel schädigen oder sie in ihrer Funktion beeinträchtigen, indem ROS DNA-Strangbrüche induziert, Proteine inaktiviert oder zur Lipidperoxidation führt (Forman et al., 2004). Die Exposition von Zellen mit Feinstaub verursacht oxidativen Stress, indem es zur Bildung von 4-Hydroxynonenal (Esterbauer et al., 1991) und GSSG, der oxidierten Form von GSH kommt (Rahman et al., 2005). Diese Veränderung der Redoxbalance in der Zelle in Richtung erhöhten Oxidationsstatus geht mit einer Acetylierung von Histonen einher (Stone et al., 1998), wodurch der Zugang des transkriptionellen Komplexes an die Promotorregion der DNA ermöglicht wird. Nach der Translokation der redoxsensitiven NF $\kappa$ B und AP-1 Transkriptionsfaktoren aus dem Zytosol in den Nucleus wird folglich der Zugang zur Promotorregion ermöglicht (Jimenez et al., 2000). Es kommt zur Transkription von pro-entzündlichen Genen, zur Translation und damit zur Synthese und Freisetzung von pro-entzündlichen Mediatoren (Li et al., 1999). Dazu zählen Zytokine wie TNF-alpha, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, ICAM-1, E-Selektin, iNOS und

Proteine, die an der Beseitigung des oxidativen Stress beteiligt sind, wie SOD, Katalase,  $\gamma$ -Glutamyl-Cysteinyl-Synthetase und Hämoxigenase-1. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass entweder der oxidative Stress und/oder die direkte Partikelinteraktion einen erhöhten zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel verursachen, der die Aktivierung von NF $\kappa$ B bewirken könnte, und es somit zu einer erhöhten Expression von TNF-alpha kommt (Stone et al., 2000; Dolmetsch et al., 1997). Eine erhöhte Kalziumkonzentration vermag ebenso die Generierung von ROS anzuregen, die zu einer positiven Rückkopplung führen kann (Sen et al., 1996). Eine Kombination dieser Mechanismen führt zur Entzündungsreaktion.

### 2.3.1.2 Entzündungsreaktion

Die Inhalation von feinen und ultrafeinen Partikeln löst zunächst eine auf oxidativen Stress basierte lokal begrenzte akute Entzündung in der Lunge aus (Andre et al., 2006; Salvi et al., 1999). Die durch Makrophagen sowie Epithelzellen freigesetzten Mediatoren können weitere Zellpopulationen wie Endothelzellen und Leukozyten aktivieren (Salvi et al., 1999), wodurch es einerseits zur Verstärkung der lokalen pulmonalen Entzündungsreaktion, andererseits zur übergreifenden systemischen Entzündungsreaktion durch die Freisetzung von Mediatoren in die Blutzirkulation kommen kann (Beck-Speier et al., 2005; Chang et al., 2005; Brook et al., 2004). Dieser Vorgang ist durch einen veränderten Blutfluss in den Blutgefäßen (Hämodynamik), durch den Austritt von Plasmabestandteilen aus den Blutgefäßen und durch das Einwandern (Diapedese) von neutrophilen Granulozyten ins Entzündungsgebiet geprägt. Die Diapedese beginnt intravasal mit einer Anheftung der Abwehrzellen an das Gefäßendothel und wird durch Adhäsionsmoleküle (Kvietys and Sandig, 2001) sowie durch Zytokine vermittelt. Diese Oberflächenproteine (z.B. Integrine, Selektine) werden auf Endothelzellen sowie auf Entzündungszellen exprimiert und vermitteln den Zell-Zell-Kontakt zwischen Gefäßwand und den im Blut zirkulierenden Leukozyten (Kvietys and Sandig, 2001). Nach der Adhäsion wandern die Leukozyten zwischen den Endothelzellen hindurch und gelangen zunächst in tiefere Schichten der Gefäße und von dort schließlich ins umgebende Gewebe. Dabei werden wiederum Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, CXCL-1, CXCL-2, CXCL-5, TNF-alpha und GM-CSF zunehmend in die Blutzirkulation freigesetzt, welche die Chemotaxis und die Verbreitung der Entzündung auf weitere zirkulierende Leukozyten aber auch die Rekrutierung aus dem Knochenmark veranlassen und damit für eine positive Rückkopplung sorgen.

## **2.3.2 Systemische Mechanismen**

### **2.3.2.1 Akute-Phase-Reaktion**

Die Akute-Phase-Antwort ist charakterisiert durch eine Erhöhung der Leukozytenzahl, durch Fieber und durch erhöhte Gefäßdurchlässigkeit für Plasmabestandteile (Kvietys and Sandig, 2001). Darüber hinaus erscheinen die von der Leber freigesetzten Akute-Phase-Proteine innerhalb weniger Stunden nach einer Partikelexposition im Blutkreislauf (Suwa et al., 2001; 2002b). Möglicherweise sind sie für multiple Effekte auf das kardiovaskuläre System verantwortlich, wie einem erhöhten Gerinnungszustand des Blutes, die zu einem Herzinfarkt führen können (MacNee and Donaldson, 2000; Nemmar et al., 2002). Während einer Entzündungsreaktion werden aus der Lunge bzw. von Endothelzellen Mediatoren wie zum Beispiel die Interleukine IL-1, IL-2 oder IL-6 freigesetzt, die das Knochenmark zur Produktion und zur Freisetzung von Leukozyten in die Blutzirkulation stimulieren (Tan et al., 2000). Zudem wird die Leber hauptsächlich durch IL-1 und IL-6 zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen angeregt. Die Akute-Phase-Proteine bilden eine Klasse von sekretorischen Proteinen, die während der akuten systemischen Entzündungsreaktion in der Leber synthetisiert und dann ins strömende Blut abgegeben werden. Diese werden oft als diagnostische Marker für eine Entzündungsreaktion verwendet. In diese Klasse sind das C-reaktive Protein (CRP), das Fibrinogen, das Haptoglobin, die C3-Komponente des Komplementsystems sowie das Mannose bindende Lektin einzuordnen (Vermeire et al., 2004; Andreotti et al., 1999; Kilpatrick, 2002; Wang et al., 2001; Sahu and Lambris, 2001). Es handelt sich um lösliche Faktoren, Opsonine, deren Wirkung eine Steigerung der Phagozytosefähigkeit, die Aktivierung des Komplementsystems, die Kontrolle des Gerinnungssystems und die Unterstützung von Wundheilungsprozessen fördert. Systemische Akute-Phase-Reaktionen (mit Anstieg des C-reaktiven Proteins, des Fibrinogens und u.U. der zirkulierenden Granulozyten) waren sowohl in epidemiologischen als auch in toxikologischen Studien nach Partikelexpositionen wiederholt nachweisbar (Peters et al., 2005; Suwa et al., 2001; Suwa et al., 2002b; van Eeden et al., 2001).

### **2.3.2.2 Gerinnungsfördernder Status**

Wenn ein Gefäß verletzt wird oder es nach erfolgter Zellschädigung zur Endothelverletzung kommt, erhält das Blut Zugang zu dem subendothelialen Bindegewebe, unter anderem mit Kollagenfasern. Bei der primären Hämostase kommt es zur Adhäsion und zur Aggregation von Thrombozyten an subendotheliales Bindegewebe. Die Adhäsion wird durch den von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt, einem löslichen Blutprotein, welches von aktivierten

oder geschädigten Endothelzellen freigesetzt wird. Der vWF vermittelt die Verbindung zwischen Kollagenfasern und dem Glykoprotein-Ib/IX-Rezeptor auf den Thrombozyten (Lerman and Zeiher, 2005). Auch die interzelluläre Aggregation von Thrombozyten wird vom vWF, sowie von Fibrinogen vermittelt. Der normale physiologische Ablauf der Gerinnungsreaktion (extrinsisches System oder exogener Mechanismus) wird durch Kontakt von Blut mit Gewebe-Thromboplastin (auch *tissue factor*, TF oder Faktor III genannt) aus verletztem subendothelialen Gewebe initiiert (sekundäre Hämostase). Gewebe-Thromboplastin ist ein Membranprotein, welches beispielsweise in der Adventitia von Blutgefäßen (Subendothel) vorkommt. Es wird von Endothelzellen nur nach deren Aktivierung oder Schädigung (Dysfunktion) freigesetzt und bildet einen Komplex mit Faktor VII, der in seine aktive Form (Faktor VIIa) überführt wird, leitet die Bildung von  $\alpha$ -Thrombin aus Prothrombin ein und gibt damit den ersten Anstoß für die Blutgerinnung (Haidaris et al., 1997). Dabei werden von Fibrinogen die Fibrinopeptide A und B vom aminoterminalen Ende der A $\alpha$ - und B $\beta$ -Ketten abgespalten, die zur Aktivierung von Thrombozyten beitragen. Nachfolgend kommt es zur spontanen Polymerisation der Fibrinmonomere, die unter Anwesenheit von Transglutaminase (Faktor XIIIa) zu einem stabilen Fibrinnetzwerk quer vernetzt werden. In das Netz werden rote Blutkörperchen eingefangen, ein sogenannter roter Thrombus bildet sich. Durch den PDGF (*platelet-derived growth factor*) wird außerdem das Eindringen von Bindegewebszellen gefördert: Die Wundheilung beginnt. Allerdings kann das Fibringerinnsel aufgrund der Wirkung des fibrinolytischen Systems durch Plasmin wieder aufgelöst werden. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass nach der Inhalation von Feinstaub sowohl die Akute-Phase-Reaktion als auch die Endothelaktivierung zu einem verstärkten gerinnungsfördernden Status führten, der durch untersuchte Endpunkte wie zum Beispiel der vWF, Faktor VII, Fibrinogen oder dessen Degradationsprodukte sowie verkürzte Blutungszeiten (Hämostase) gemessen wurde (Utell et al., 2000; Ruckerl et al., 2006; Nemmar et al., 2003a; Khandoga et al., 2004).

### **2.3.2.3 Endothelaktivierung und endotheliale Dysfunktion**

Bei allen Überlegungen sollten die Endothelzellen der vaskulären Gefäße nicht außer Acht gelassen werden, da gerade die Endothelzellen an der Regulation des vaskulären Tonus, des Blutdrucks, an der Leukozytenrekrutierung und bei den prothrombotischen Prozessen beteiligt sind und damit einen großen Einfluss auf die Progression kardiovaskulärer Erkrankungen besitzen. Endothelzellen synthetisieren zahlreiche Substanzen, die als Vasodilatoren oder Vasoconstriktoren fungieren. Diese Substanzen werden durch humorale und mechanische Stimuli, wie Scheerstress freigesetzt und beeinflussen die darunterliegende glatte Gefäßmuskulatur. Zu

den wichtigsten Vasodilatoren zählen NO und Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>), wobei Endothelin-1 und der Thrombozyten aktivierende Faktor (PAF) die wichtigsten Vasokonstriktoren repräsentieren (Cines et al., 1998; Galley et al., 2004). Die Interaktionen zwischen Endothelzellen und Leukozyten über Adhäsionsmoleküle sowie der Einfluss von Mediatoren (Zytokine) führen bei einer Entzündungsreaktion zur Aktivierung der Endothelzellen. Es kommt folglich zur Freisetzung von Zytokinen, die für die Chemotaxis und Rekrutierung von Leukozyten bei akuten Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen (Jang et al., 1994). Phänomenologisch kann eine Endothelaktivierung über die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen oder Stressgenen, der Sekretion von pro-entzündlichen Mediatoren (Zytokinen) charakterisiert werden (Salvi et al., 1999). Zu den am besten untersuchten Adhäsionsmolekülen zählen P-, E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1, die für das Rollen von Leukozyten entlang des Endothels (*Rolling*) sowie der Anheftung und der Migration von Leukozyten verantwortlich sind. Für Zytokine wie Interleukine wie IL-1, IL-6 und TNF-alpha ist bekannt, dass sie die Expression von den vorgenannten Adhäsionsmolekülen induzieren. Darüber hinaus werden erhöhte Mengen dieser Marker im Plasma als Indikator für vaskuläre Erkrankungen gemessen, welche durch proteolytischen Abbau und durch Metalloproteinasen der Ektodomäne entstehen, die mit dem Schweregrad des Erkrankungsprozesses zu korrelieren scheinen (Tsakadze et al., 2002).

Unter der endothelialen Dysfunktion versteht man eine funktionelle Veränderung des Endothels, die heute als eine frühzeitige, reversible Manifestation der Atherosklerose gilt. Die endotheliale Dysfunktion ist eine generalisierte Erkrankung, die sogar in arteriellen Gefäßen ohne artherosklerotische Veränderungen vorkommt, wie z.B. in der Brachialarterie. Es zeigt sich eine eingeschränkte endothelabhängige Vasodilatation verursacht durch die verminderte Produktion oder Inaktivierung von anti-atherogenen Substanzen, hauptsächlich von NO (EDRF). Auch eine Erhöhung des Endothelin-1-Spiegels wird nach der Partikelexposition beobachtet, wobei Endothelin-1 als Vasokonstriktor wirkt, während die Aktivität des *angiotensin cleaving enzyme* (ACE) meist herabgesetzt wird (Ulrich et al., 2002). Dies, verbunden mit einer Abnahme des NO-Spiegels, führt zu einem prokoagulativen Zustand, welcher zu den oben beschriebenen kardiovaskulären Beeinträchtigungen führen kann, die wiederum zu Thrombosen, der Progression artherosklerotischer Prozesse und letztlich zum Herzinfarkt führen können. Ein entscheidender Faktor bei all diesen Vorgängen ist offensichtlich die in-vivo schwer zu erfassende komplexe Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen und Geweben. Auch erhöhte Cholesterinkonzentrationen im Serum oder gesteigerte Scherkräfte bei Hypertonie führen zu einer Abnahme der endogenen, endothelialen NO-Produktion. Die Durchlässigkeit



des Endothels nimmt zu, wodurch sich vorwiegend Lipoproteine mit niedriger Dichte (LDL-Cholesterin) sowie Gerinnungsfaktoren wie der von-Willebrand-Faktor in der Intima anreichern, wodurch es zur Progression artherosklerotischer und thrombotischer Prozesse kommen kann.

#### **2.3.2.4 Progression artherosklerotischer Prozesse**

Der Verlust der Stickstoffmonoxid(NO)-vermittelten Gefäßerweiterung ist das Kennzeichen einer endothelialen Dysfunktion, die bereits in der Frühphase der Atherosklerose nachweisbar und ursächlich mit dieser Erkrankung verbunden ist (Simon et al. 1999). Die bekannten klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Nikotinkonsum, Diabetes mellitus und Fettleibigkeit erhöhen den oxidativen Stress in den Endothelzellen und gehen mit einem Abnehmen der endothelvermittelten Vasodilatation (Gefäßverengung) einher (Simon et al. 1999). Diese Beobachtungen konnte Sun und Mitarbeiter (2005) mit ihrer umweltrelevanten Langzeitexpositionsstudie mit PM bestätigen. Darüber hinaus gab es auch Hinweise auf pro-entzündliche Reaktionen hinsichtlich einem erhöhten Vorkommen von CD68 positiven Leukozyten in den fettreichen Plaques. So ist die endotheliale Adhäsion von Monozyten mit nachfolgender Migration in den subendothelialen Raum ein zentraler Vorgang in der Entwicklung von frühen atherosklerotischen Läsionen. Im subendothelialen Raum transformieren diese Zellen dann zu Makrophagen, die sich durch eine unkontrollierte Aufnahme von oxidiertem LDL über den Scavenger-Rezeptor zu den typischen Schaumzellen entwickeln. Makroskopisch zeigen sich gelbliche, streifenförmige Formationen, die sogenannten *fatty streaks* (flache, fettreiche Plaques). Die Intimaläsionen bedingen eine Anlagerung von Thrombozyten. Es kommt zu einer Migration von glatten Muskelzellen der Media in die Intima sowie zu deren Proliferation. Die Muskelzellen bilden Kollagene, Elastin und Proteoglykane in einem Ausmaß, so dass die resultierende Intimaverdickung (initiale Sklerosierung) oder gar erste fibröse Plaques sonografisch feststellbar sind (Simon et al., 1999). Zahlreiche Studien belegen derartige progressive Veränderungen nach der Exposition von Feinstaub (Künzli et al., 2005; Sun et al., 2005; Suwa et al., 2002a).

#### **2.3.2.5 Störung des vegetativen Nervensystems und der Gefäßmotorik**

Die durch PM ausgelösten Mechanismen, die zu den gemessenen Effekten in den zahlreichen epidemiologischen und toxikologischen Studien führen, sind noch nicht ausreichend bekannt. Erste Ansätze gibt es mit den beobachteten Veränderungen im Herzfrequenzanstieg und in der

HRV-Abnahme nach der Partikelexposition. Diese implizieren ein erhöhtes Risiko eines kardialen Vorfalles, das durch eine Imbalance zwischen sympathischen und parasympathischen Komponenten des vegetativen Nervensystems getriggert wird. Ursächlich hierfür wird im Zusammenhang mit der Partikelinhalation eine mögliche Irritation der Rezeptoren im respiratorischen System mit einem Anstieg des sympathischen Tonus gemacht, wobei auch systemisch entzündliche Prozesse sowie direkte Partikel-Zell-Wechselwirkungen im Herzen in Betracht gezogen werden. Darüber hinaus spielen hier auch psychogene Faktoren wie Angst, Übermüdung, vor allem aber Stress eine große Rolle auf die Balance zwischen Sympathikus und Parasympathikus.

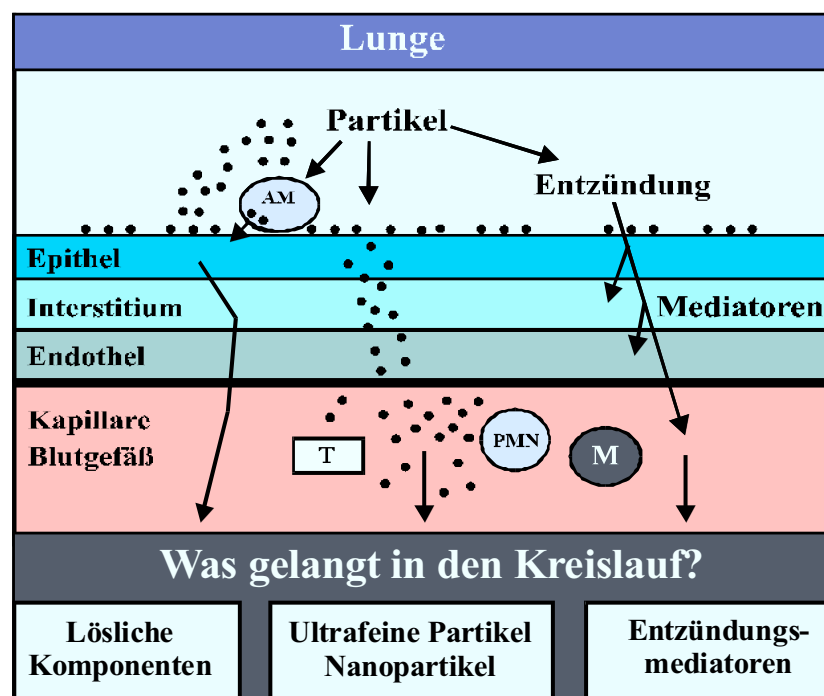
Ein Anstieg des sympathischen Tonus und/oder die Modulation des basalen systemischen vaskulären Tonus aufgrund von erhöhten Endothelin-Konzentrationen, die mit der PM-Exposition assoziiert sind, wurden als mögliche Mechanismen für den beobachteten Blutdruckanstieg diskutiert (Ibald-Mulli et al., 2001). Eine alterierte Funktion in der Gefäßmotorik wird hauptsächlich nach der Partikelinhalation mit einer eingeschränkten endothelial vermittelten Vasodilatation oder umgekehrt mit erhöhten Endothelin-1 Konzentrationen festgestellt. Die Beeinflussung der Gefäßmotorik ist generell ein komplexes Feld, indem das vegetative System seinen direkten Einfluss vermittelt. Darüber hinaus wird die Gefäßmotorik über metabolische Aktivität des Gewebes (Hypoxie, Hyperkapnie, pH-Wert), über mechanische Faktoren wie Scherstress, über das Renin-Angiotensin-System sowie über das Endothelsystem beeinflusst.

### **2.3.2.6 Herzrhythmusstörungen**

Die Beobachtung von Erregungsrückbildungsstörungen an ischämieerkrankten Menschen sowie das Auftreten von Herzrhythmusstörungen hatte die Frage nach der Induktion einer elektrischen Instabilität durch veränderte Ionenkanalfunktionen der Herzzellen aufgeworfen (Pekkanen et al., 2002) und konnte in-vitro bestätigt werden (Schulz et al., 2005). Eine elektrophysiologische Instabilität kann verschiedene Ursachen haben: (1) nach einem Herzinfarkt (*Angina Pectoris*), (2) eine erhöhte Belastung des Herzens, z.B. durch Bluthochdruck und/oder Herzinsuffizienz, (3) Elektrolytstörungen, (4) entzündliche Veränderungen des Myokards wie Myokarditis oder Kardiomyopathie und (5) psychogene Faktoren, wie zum Beispiel Angst, Übermüdung und/oder Stress mit Aktivierung des Sympathikus, (6) sekundär aufgrund anderer Erkrankungen, wie z.B. Hyperthyreose, oder (7) durch Medikamente. Der durch die Partikelinhalation getriggerte Mechanismus bis hin zur elektrophysiologischen Beeinflussbarkeit ist noch nicht aufgeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

## 2.4 Entstehung systemischer Effekte - Mediatoren aus der Lunge oder Translokation ultrafeiner Partikel?

In diesem Zusammenhang steht die Frage im Vordergrund: „Was gelangt überhaupt in den Blutkreislauf und beeinträchtigt so die Gesundheit?“ Man geht davon aus, dass die Partikel oder deren lösliche Bestandteile ihre gesundheitsschädlichen Wirkungen auf zwei unterschiedliche Wege auslösen. Die derzeit diskutierten Arbeitshypothesen sind in Abbildung 2 dargestellt. Zum einen könnten die Partikel, neben der direkten lokalen Wirkung – der Entzündungsreaktion – in der Lunge, „indirekt“ auf das kardiovaskuläre System wirken, indem die Wirkung durch in die Blutbahn freigesetzte Entzündungsmediatoren zur Diskussion steht (Seaton et al., 1995). Zum anderen könnten sie „direkt“ durch Translokation auf die extrapulmonalen Zielzellen (Organe) wirken.



**Abbildung 2:** Wege der systemischen Wirkung von inhaliertem Feinstaub (Schulz et al., 2005). AM = Alveolar-makrophagen, T = T-Lymphozyten, PMN = neutrophile Granulozyten, M = Monozyten

Dabei können lösliche Bestandteile der Partikel – insbesondere spielen Salze von Metallen und die lösliche Fraktion der Organika hier eine Rolle – die nach der Deposition von Feinstaub bzw. von ultrafeinen Partikeln im Atemtrakt in Lösung gehen, in das Kreislaufsystem gelangen und sich in niedrigsten Konzentrationen im Serum nachweisen lassen (Campen et al., 2002; Gilmour et al., 2005; Kodavanti et al., 2002). Zahlreiche Studien belegen, dass ins-

besondere unlösliche ultrafeine Partikel, die z.T. nur einen Durchmesser von wenigen Nanometern aufweisen, die Luft-Blut-Schranke überwinden können und mit dem Blut in die verschiedensten Organe wie Leber, Milz, Herz und Gehirn transportiert werden und mit den extrapulmonalen Zielzellen wechselwirken (Kreyling et al., 2002; Semmler et al., 2004; Oberdörster et al., 2002). Auch additive Effekte mit der Freisetzung von Mediatoren aus der Lunge sind daher denkbar (Delfino et al., 2005; Salvi et al., 1999). Voraussetzung für die „direkte“ Wirkung der Partikel auf sekundäre Zielorgane ist deren Translokation über die Luft-Blut-Schranke hinweg. Dabei müssten die Partikel einen Weg durch die Epithelzellen der Alveolen und durch die Endothelzellen der Kapillargefäße hindurch oder an ihnen vorbei nehmen. Demnach werden Endo- und Transzytose auf zellulärer Ebene als Transportmechanismen durch die Zellmembran der alveolaren Zellen diskutiert, da ultrafeine Partikel membranumschlossen in der Zelle nachgewiesen werden können (Takenaka et al., 2006). Andererseits konnten Geiser und Mitarbeiter (Geiser et al., 2005) zeigen, dass am Rattenmodell nach Inhalation von ultrafeinen Titandioxidpartikeln etwa 20 % der deponierten Partikel im Lungenparenchym nachweisbar sind und dass diese Partikel überwiegend „frei“, d.h. nicht membranumschlossen, im Zytosol der Zellen vorliegen.

Die Beobachtung, dass die Partikelverteilung am Ende der einstündigen Inhalation und nach 24 Stunden identisch war, zeigt, dass die Translokation dieser Partikel anscheinend sehr schnell erfolgt. Für ultrafeine Teflon-Partikel mit einem Durchmesser von 20 nm konnte nach deren Inhalation gezeigt werden, dass sie schnell durch das Lungenepithel von Ratten und Mäusen transportiert werden können (Oberdörster et al., 2000). Zudem wurde nach der Inhalation von radioaktiv markierten ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln der Übergang in die Blutbahn beim Menschen nachgewiesen (Nemmar et al., 2002a). Eine ebenfalls mit radioaktiv markierten ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln durchgeführte Inhalationsstudie mit Ratten fand einen signifikanten Anteil der inhalierten Partikel in der Leber deponiert, jedoch nicht in anderen Organen (Oberdörster et al., 2002). Langzeitstudien über ein halbes Jahr an Ratten zeigten, dass der Organismus nach einmaliger Inhalation von radioaktiv markierten Iridium-Partikeln über *Clearance*-Mechanismen verfügt, die im Untersuchungszeitraum zu einer deutlichen Reduktion der Partikelanzahl in den verschiedenen Organen führten. Diese Studie zeigt auf, dass die Retention der Partikel in der Lunge sehr hoch ist und nur ein sehr kleiner Anteil von weniger als 1 % der Partikel in den Kreislauf übergeht. Interessanterweise konnten die Partikel auch hier größtenteils in der Leber nachgewiesen werden (Kreyling et al., 2002, Semmler et al., 2004). Auch eine Exposition von Ratten und Mäusen mit ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln zeigte eine vergleichbare starke Retention der Partikel in der Lunge (Elder et

al., 2005). Des Weiteren erbrachte eine humane Studie, dass 6 Stunden nach Inhalation Technetium-99m markierte Kohlenstoff-Nanopartikel noch zu 95 % in der Lunge zu finden sind (Mills et al., 2006). Letztendlich weisen diese Studien auf eine Translokation hin, wobei der Anteil der systemisch verfügbaren Partikel relativ gering ist – etwa 1 % der im Atemtrakt deponierten Menge. Jedoch muss man diesen geringen Anteil in Relation zu der potenziell täglich im Atemtrakt deponierten Partikelanzahl sehen, die im hoch belasteten innerstädtischen Bereich durchaus  $1 \times 10^9$  bis  $10^{10}$  Partikel pro Tag betragen kann. Damit darf diese Dosis hinsichtlich kardiovaskulärer Negativeffekte nicht unterschätzt werden.

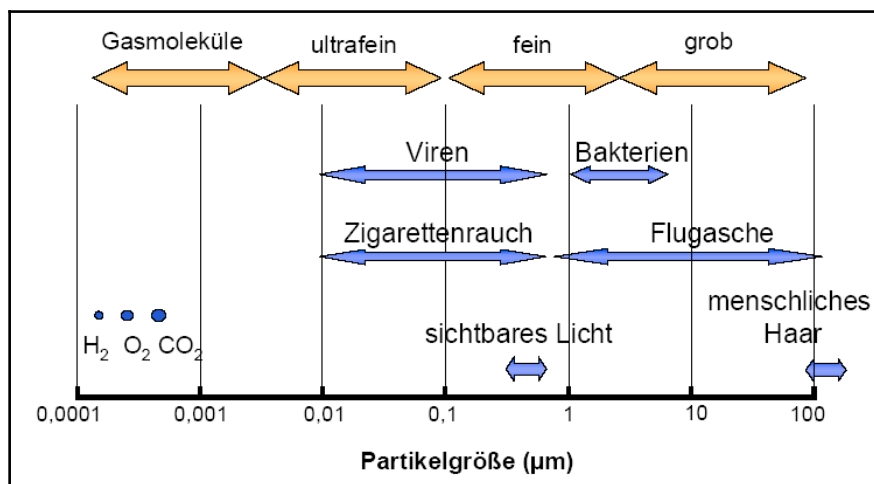
## 2.5 Was befindet sich in der Umweltluft – Feinstaub & UFP

Die Bedeutung einer sauberen Umwelt für seine Lebensqualität hat der Mensch für sich mittlerweile erkannt. Die Qualität unserer Atemluft hat sich in den letzten Jahren merklich verbessert, dennoch wurden seit Mitte der 80er Jahre vermehrt epidemiologische Studien über gesundheitliche Beeinträchtigungen der Menschen durch Luftschadstoffe veröffentlicht (Dockery et al., 1989; Korn et al., 1987; Utell et al., 1988; Ware et al., 1986). Diese Studien belegen Auswirkungen von Schadstoffen in der Luft auch bei Konzentrationen weit unterhalb der Grenzwerte und führen diese zum Großteil auf die inhalierbare Fraktion des Feinstaubes zurück.

Unter Feinstaub versteht man die in der Gasphase suspendierten Partikel mit einem Durchmesser zwischen 1 nm und 100  $\mu\text{m}$  (Brook et al., 2004). Dabei stammen die Partikel sowohl aus natürlichen als auch aus anthropogenen Quellen. Der weitaus besorgniserregendere Staubanteil stammt allerdings aus anthropogenen Quellen. Dazu gehören Ruß von Verbrennungsprozessen (Industrie, Heizungen, Kerzenbrand), Straßenverkehr (Motorenabgase, Dieselsruß, Katalysatorausstoß, Abrieb von Reifen, Bremsen und Kupplungen), Küchentätigkeiten (Kochen, Braten, Grillen) und Zigarettenrauch (Vinzents et al., 2005; Brook et al., 2004).

Um eine einheitliche Klassifizierung zu ermöglichen, werden die in der Luft vorhandenen Partikel anhand des aerodynamischen Durchmessers eingeteilt. Dieser ist definiert als der Durchmesser einer Kugel mit der normierten Dichte von  $1 \text{ g/cm}^3$ , welche die gleiche Sinkgeschwindigkeit wie der Partikel selbst hat. Der Gesamtfeinstaub oder TSP (*total suspended particles*) kann nach der Größe der Partikel in verschiedene Fraktionen unterteilt werden. Eine Übersicht über den Größenbereich und die Einteilung von Feinstaub in ultrafein ( $\text{PM}_{0,1} < 0,1 \mu\text{m}$ ), fein ( $\text{PM}_{2,5} < 2,5 \mu\text{m}$ ) und grob ( $\text{PM}_{10} < 10 \mu\text{m}$ ) ist in Abbildung 3 gegeben. Ultrafeine Partikel werden auch als Nanopartikel bezeichnet, wobei in diesem Zusammenhang die verbrennungsgenerierten Nanopartikel hervorzuheben sind (Donaldson et al., 2005; Donald-

son und Stone, 2003). Dabei kommen die ultrafeinen Partikel sowohl als einzelne Partikel als auch als Aggregate vor. Ultrafeine Partikel zwischen 10 und 100 nm können im tracheobronchialen Bereich aber vor allem in den Alveolen deponieren. Die Partikelgröße und das Depositionsverhalten bestimmen wie tief die Teilchen in die Lunge eindringen können. Je kleiner die Partikel sind, desto mehr können in die Alveolen gelangen (Oberdörster et al., 2005). Allerdings unterscheiden sich Partikel nicht nur in Bezug auf die Größe, sondern auch hinsichtlich ihrer Oberfläche und den darauf reaktiven Komponenten. So können Partikel Übergangsmetalle (*transition metals*, u.a. Eisen) enthalten und organisch-chemische Verbindungen an ihrer Oberfläche binden. Zu Letzteren gehören dabei polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und deren Stickstoff-Derivate, Sauerstoff enthaltende PAK-Derivate (z.B. Ketone, Chinone), heterozyklische organische Verbindungen, Aldehyde sowie aliphatische Kohlenwasserstoffe (Xia et al., 2004). Diese organischen Komponenten sind beispielsweise in Dieselrußpartikeln (DEP) enthalten und sind bekannt dafür in Tierversuchen Entzündungsreaktionen und sogar Krebs zu verursachen (Gerde et al., 2001).



**Abbildung 3:** Partikel werden aufgrund ihrer Größe (aerodynamischer Durchmesser) in die Fraktionen  $PM_{0,1}$  = ultrafein ( $< 0,1 \mu m$ ),  $PM_{2,5}$  = fein ( $< 2,5 \mu m$ ) und  $PM_{10}$  = grob ( $> 2,5 \mu m$ ) eingeteilt

Die potenzielle Toxizität der Partikel wird vor allem durch die lokale Dosis bestimmt, die wiederum von der chemischen Zusammensetzung, der Konzentration und der Größe der Partikel abhängt (Borm und Kreyling, 2004). Mit der Abnahme der Partikelgröße steigen bei gleicher Masse die Oberfläche und die Anzahl der Partikel stark an. Entsprechend weist eine Probe, die aus Teilchen mit einem aerodynamischen Durchmesser von 10 nm besteht, eine 300-mal größere Oberfläche und eine 1.000.000-mal so große Teilchenzahl auf, wie eine Probe gleicher Gesamtmasse aus 1 µm großen Partikeln (Krug et al., 2004). Folglich haben ultrafeine Partikel ( $PM_{0,1}$ ) aufgrund des hohen Oberflächen-Massen-Verhältnisses eine erhöhte

biologische Toxizität und gelten somit als besonders gesundheitsgefährdend (Donaldson und Stone, 2003). Dennoch gilt seit dem 1. Januar 2005, entsprechend einer 1999 beschlossenen Richtlinie, als Maß ein Grenzwert von  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  für den 24-Stunden-Mittelwert von  $\text{PM}_{10}$  und nicht für UfP ( $\text{PM}_{0,1}$ ). Dabei sind 35 Überschreitungen pro Jahr erlaubt und ein Jahresmittelwert von  $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$  für  $\text{PM}_{10}$  darf nicht überschritten werden. Ab 2010 soll immer noch ein Grenzwert für  $\text{PM}_{10}$  von  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  für den 24-Stunden-Mittelwert gelten, aber dabei nur noch 7 Überschreitungen pro Jahr erlaubt sein. Der Jahresmittelwert darf dann  $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$  für  $\text{PM}_{10}$  nicht überschreiten. Da Dieselrußpartikel in der aktuellen öffentlichen Diskussion als eine wichtige Ursache für die Überschreitung der zugelassenen Höchstgrenze der Feinstaubkonzentration angesehen werden, stehen Maßnahmen mittels Dieselrußfilter zur Reduktion von  $\text{PM}_{2,5}$  dieses Schadstoffes im Vordergrund. Unter Berücksichtigung aktueller aerosoltoxikologischer Aspekte ist die Reduktion der feinen und ultrafeinen Dieselrußpartikel eine wichtige Maßnahme, wobei aber die potenziell schädlichste, ultrafeine Fraktion bislang noch nicht berücksichtigt wird.

## 2.6 Einfluss ultrafeiner Partikel auf das kardiovaskuläre System

Aktuelle epidemiologische Befunde haben die Frage aufgeworfen, ob allein die Reduktion der Partikelmasse ausreicht, um gesundheitliche Schäden durch Verbrennungsaerosole zu verhindern. Aufgrund verbesserter Messmethoden konnte eine weitere Studie in Erfurt, Deutschland, (Wichmann et al., 2000) aufzeigen, dass, trotz einer deutlichen Reduktion der Partikelmasse im letzten Jahrzehnt, die Anzahl ultrafeiner Partikel mit geringer Masse zugenommen hat. Die dort erhobenen Morbiditäts- und Mortalitätsdaten weisen besonders auf die gesundheitsschädigende Wirkung ultrafeiner Partikel ( $\text{PM}_{0,1}$ ) auf den Organismus hin. Dieser Befund wird auch durch klinische Untersuchungen von Patienten mit akuten und chronischen kardio-pulmonalen Erkrankungen gestützt (Goldberg et al., 2001), wobei die Effekte durch einen Anstieg ultrafeiner Partikel beschrieben werden. Auch Penttinen und Mitarbeiter (2001a; 2001b) fanden deutliche Zusammenhänge zwischen einem Anstieg der Anzahl ultrafeiner Partikel und der Verschlechterung des Gesundheitszustandes von Asthmatikern. Letztlich deuten diese Untersuchungen darauf hin, dass die Reduktion der Partikelmasse demnach alleine nicht ausreicht, um die Gefährdung, die von der partikulären Luftverschmutzung ausgeht, zu reduzieren. Vor allem die ultrafeinen Partikel mit einer vernachlässigbaren Partikelmasse aber einer großen Anzahl scheinen für die Entstehung von respiratorischen und kardiovaskulären Effekten eine große Rolle zu spielen (Wichmann et al., 2000; Donaldson et al., 2005). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass neben den chemischen Eigenschaften der

Partikel die Anzahl bzw. die Oberfläche der Partikel für die beobachteten pathophysiologischen Prozesse verantwortlich sein könnten (Oberdörster et al., 1994; Seaton et al., 1995). In einfacheren Worten ausgedrückt: je kleiner die Partikel, desto größer die schädlichen Auswirkungen auf die Gesundheit. Folglich haben ultrafeine Partikel aufgrund des hohen Oberflächen-Massen-Verhältnisses eine erhöhte biologische Toxizität (Oberdörster et al., 2005; Donaldson und Stone, 2003). Dies belegte auch die Arbeit von Stoeger und Mitarbeitern (2006), in der Mäuse mit unterschiedlichen Kohlenstoffpartikeln instilliert wurden. Unter anderem konnte eine erhöhte biologische Wirkung, gemessen mit der Zunahme von neutrophilen Granulozyten in der bronchioalveolären Lavage-Lösung, mit einem korrelierbaren Anstieg der Partikeloberfläche bei gleicher Masse von unterschiedlichen ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln gezeigt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass epidemiologische und toxikologische Studien der letzten Jahre auf die Inhalation von gerade ultrafeinen Partikeln als Auslöser für die lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen weisen, die mit nachfolgenden Veränderungen in der kardiovaskulären Funktion, durch eine systemische Entzündungsreaktion (Danesh et al., 2000; Salvi et al., 1999) mit einer endothelialen Dysfunktion (Künzli et al., 2005; Ulrich et al., 2002) und durch prothrombotische Prozesse (Ruckerl et al., 2006) gekennzeichnet sind. Damit kommt es zur Progression von pathophysiologischen kardiovaskulären Erkrankungen und Herzvorfällen, die letztlich zum Tode führen können. Toxikologische Studien weisen jedoch darauf hin, dass gerade die UfP sowie daraus lösliche Bestandteile wie Metalle durch die Luft-Blut-Schranke translozieren (Kreyling et al., 2002; Wallenborn et al., 2007) und direkte mikrovaskuläre Effekte verursachen können (Nemmar et al., 2002). Dabei wurden entweder prothrombotische Effekte ohne Hinweise auf eine Entzündungsreaktion beobachtet (Khandoga et al., 2004), oder diese Effekte traten zeitlich vor der akuten Entzündungsreaktion ein (Nemmar et al., 2002). Weiterhin wurden auch translozierte Metalle für eine mögliche elektrophysiologische Störung der Herzmuskelzellen beobachtet (Schulz et al., 2005), die mit Herzrhythmusstörungen und einem akuten Herzinfarkt assoziiert werden können (Penttinen et al., 2002). Zum einen werden durch die Lungenentzündung „indirekte“ Wirkungen auf das kardiovaskuläre System durch in die Blutbahn freigesetzte Entzündungsmediatoren diskutiert, zum anderen durch die in die Blutbahn eingedrungenen ultrafeinen Partikel oder durch die aus den Partikeln freigesetzten löslichen Substanzen wie Metalle (Schulz et al., 2005). Die Frage welche dieser Mechanismen die kardiovaskulären Effekte tatsächlich verursachen bleibt bislang noch unbeantwortet und soll mit dieser Arbeit aufgegriffen und beantwortet werden.



## 3 Versuchstiere und Methoden

### 3.1 Versuchstiere

#### 3.1.1 Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 88 weibliche BALB/cJ Mäuse von *The Jackson Laboratory*, Bar Harbor, ME, USA bestellt und im Alter von 8 Wochen in das Helmholtz-Zentrum München, Institut für Inhalationsbiologie, geliefert. Alle Tiere wurden erst nach einem Akklimatisationszeitraum von 14 Tagen im Experiment verwendet, d.h. im Alter von 10 Wochen wurden sie für den jeweiligen Versuch eingesetzt.

#### 3.1.2 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in der Tierabteilung unseres Institutes unter standardisierten Bedingungen bei 21 - 22 °C, gefilterter Luft, 55 % relativer Luftfeuchtigkeit, hell-dunkel Lichtprogramm von 12 Std (6 Uhr bis 18 Uhr: hell) in einem *Biozone-IVC-Rack* in Typ 2-Makrolon-Käfigen mit Einstreu aus Weichholzfaser gehalten. In einem Käfig befanden sich maximal vier Tiere. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter SPF-Bedingungen. Der pathogenfreie Status der Mäuse wurde vorschriftsgemäß mit einem Gesundheitszeugnis entsprechend der *Federation of European Laboratory Animals Science Association* Richtlinien belegt.

#### 3.1.3 Tierversuchsgenehmigung

Die Tierversuche wurden von einem hausinternen Tierversuchsausschuss unter wissenschaftlichen und ethischen Aspekten sowohl begutachtet als auch befürwortet und von der zuständigen Genehmigungsbehörde legitimiert (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-115-05).

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Applikationsformen von UfCP

Es wurden zwei unterschiedliche Applikationsmethoden von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln (UfCP) durchgeführt. Zum einen die Inhalation von UfCP und zum anderen die systemische Infusion von UfCP, deren Dosis vergleichbar zu den translozierten Partikeln – vom Lungenepithel in die Blutzirkulation - der Partikelinhalation ist.

### 3.2.1.1 Studiendesign

Insgesamt wurden 64 BALB/c-Mäuse für das gesamte Inhalationsexperiment eingesetzt. Davon waren 32 Mäuse für die 4- und 24-stündige Partikelexposition und weitere 32 Mäuse für die entsprechend durchgeführte Reinluftexposition (Kontrollexperiment) vorgesehen. Für die Inhalationsstudie wurden von jeder Mausgruppe (Kontroll- und UfCP-exponierte Tiere) 8 Tiere für die bronchoalveoläre Lavage (BAL) und für die hämatologischen Untersuchungen sowie für die Serumgewinnung verwendet. Jeweils 4 weitere Mäuse wurden für die nachfolgende Gen- und Proteinexpressionsanalyse und nochmals die gleiche Anzahl an Tieren wurde für die histologische Untersuchung eingesetzt. Das entnommene Blut von den letzteren 8 Tieren diente der FACS-Analyse und der Plasmagewinnung sowie deren anschließenden Untersuchung (Tabelle 2).

Applikationsformen	Exposition	Expositionsdauer	Tieranzahl	untersuchte Endpunkte
Inhalation	Reinluftkontrollen	4 Std	8	BAL, Hämatologie, Serum
			4	Gen-/Proteinexpression, Zytokinscreen(Plasma), FACS
			4	Histologie, Zytokinscreen(Plasma), FACS
		24 Std	8	BAL, Hämatologie, Serum
			4	Gen-/Proteinexpression, Zytokinscreen(Plasma), FACS
			4	Histologie, Zytokinscreen(Plasma), FACS
	UfCP	4 Std	8	BAL, Hämatologie, Serum
			4	Gen-/Proteinexpression, Zytokinscreen(Plasma), FACS
			4	Histologie, Zytokinscreen(Plasma), FACS
		24 Std	8	BAL, Hämatologie, Serum
			4	Gen-/Proteinexpression, Zytokinscreen(Plasma), FACS
			4	Histologie, Zytokinscreen(Plasma), FACS
intraarterielle Infusion	KHP-Lösung	4 Std	6	Hämatologie, Gen-/Proteinexpression, Zytokinscreen(Plasma), FACS
			6	Histologie, Zytokinscreen(Plasma), FACS
	UfCP	4 Std	6	Hämatologie, Gen-/Proteinexpression, Zytokinscreen(Plasma), FACS
			6	Histologie, Zytokinscreen(Plasma), FACS

**Tabelle 2:** Studiendesign

Für die Infusionsstudie wurden insgesamt 24 Versuchsmäuse verwendet. Die eine Hälfte wurde mittels einer intraarteriellen systemischen Infusion von entweder mit in Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) suspendierten UfCP exponiert, die anderen 12 Versuchsmäuse wurden zur Kontrolle mit reinem KHP exponiert (Seite 146, 8.1.9.2; Khandoga et al., 2004).

Die Versuchsmäuse wurden nach 4-stündiger Partikelexposition untersucht. Von beiden Versuchstiergruppen wurden jeweils 6 Tiere für die hämatologische Untersuchung, für die Plasmagewinnung und die Gen- und Proteinexpressionsanalyse verwendet. Jeweils 6 weitere Mäuse wurden für die histologische Untersuchung eingesetzt. Das entnommene Blut von den letzteren 6 Tieren diente der Plasmagewinnung und der anschließenden Untersuchung.

### 3.2.1.2 Inhalation

#### 3.2.1.2.1 Experimenteller Aufbau

Zur Herstellung von ultrafeinen Partikeln aus elementarem Kohlenstoff (UfCP) wurde ein Funkengenerator GFG 1000 (PALAS, Karlsruhe, Deutschland; Modell GFG1000) verwendet, der Kohlenstoffaggregate durch Funkenüberschlag zwischen zwei hochreinen Graphitelektroden (SGL-Carbon, Wiesbaden, Deutschland; Elektrodentyp RW-0) generiert (Roth et al., 2004). Die dabei generierten ultrafeinen Kohlenstoffpartikel bestehen zu 95 % (Masse) aus elementarem Kohlenstoff (Matuschek et al., 2007).

Zur Reduzierung der elektrostatischen Ladungen auf den Partikeln wurde das Aerosol mit einer  $^{85}\text{Kr}$ -Quelle ( $\beta$ -Strahler, 0,69 MeV) neutralisiert und anschließend durch Mischung mit gefilterter Luft und Sauerstoff bei einer Luftfeuchte von etwa 40 % atembar gemacht. Die Exposition wurde in zwei Ganzkörperinhalationskammern durchgeführt, in denen sich jeweils zwei herausnehmbare Nager-Gitter-Käfige für je 16 Mäuse befanden. Die eine der beiden Kammern wurde für die UfCP-Exposition und die andere Kammer für die Reinluftexposition (Kontrollexperiment) genutzt. Futter und Wasser wurde auch während der Exposition *ad libitum* angeboten. Die Partikelkonzentration und –größenverteilung sowie die Konditionierung der Atemluft wurde ständig mit entsprechenden Messgeräten überwacht (Alessandrini et al., 2006).

#### 3.2.1.2.2 Durchführung der Inhalation

Die Exposition wurde so gestaltet, dass die 4- und 24-Stunden UfCP-Inhalationstiergruppen in jeweils einem Tierkäfig zu 16 Tieren saßen und einen gemeinsamen Expositionsstartpunkt hatten (3.2.1.1). Die einzelnen Tiergruppen wurden nach ihrer vorgesehenen Expositionszeit aus den Kammern herausgenommen. Demnach dauerte die Partikelexposition insgesamt 24 Stunden, wobei 16 Tiere schon nach 4 Stunden und weitere 16 Tiere erst nach 24 Stunden entnommen wurden. Die Reinluftexposition wurde mit der gleichen Vorgehensweise durchgeführt.

Die mittlere Anzahlkonzentration der generierten, ultrafeinen Partikel betrug  $(6,4 \pm 1,7) \times 10^6$  Partikel/cm<sup>3</sup> Atemluft, der Mediandurchmesser der Anzahldichte (CMD) lag bei 48,9 nm und die Breite der Partikelgrößenverteilung ist durch die geometrische Standardabweichung  $\sigma_g$  von 1,57 bestimmt. Die gravimetrische Messung ergab eine mittlere Massenkonzentration von 439 µg/m<sup>3</sup>. Der Massenmediandurchmesser (MMD) von 76,4 nm wurde aus der dichtegetriggerten Anzahlgrößenverteilung der UfCP bestimmt. Die Partikeloberfläche wurde nach

der Analysemethode von Brunauer-Emmet-Teller (BET) durch das Institut der Technischen Chemie II, TU München, durchgeführt. Diese ergab für die UfCP eine massenspezifische Oberfläche von  $800 \text{ m}^2/\text{g}$  und damit eine Oberflächenkonzentration von  $0,35 \text{ m}^2$  (UfCP) pro  $\text{m}^3$  Luft (Stoeger et al., 2006).

### 3.2.1.2.3 Berechnung translozierter UfCP-Anzahl nach 24 Stunden Inhalation für die intraarterielle Infusion

Die folgende Berechnung der Anzahl, Masse und BET-Oberfläche der translozierten UfCP nach der 24-stündigen Inhalation basiert auf den gemessenen Partikelkonzentrationen (in der Luft), auf den physiologischen Lungenparametern für Mäuse und auf den Messwerten für die Lungendepositions- (in Mäusen) und Translokationseffizienz (in Ratten) für agglomerierte Iridiumpartikel, die sowohl in der Struktur (Agglomerate) als auch in der Größe den UfCP ähnlich sind. Folgende Parameter werden verwendet:

- Anzahl- ( $n$ ) und Massenkonzentration ( $m$ ) der UfCP in der inhalierten Luft:

$$n = 6,4 \times 10^6 / \text{cm}^3 \text{ (siehe oben)}$$

$$m = 439 \text{ } \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{ (siehe oben)}$$

- Atemzugvolumen der Maus (Tidalvolumen):  $V_T = 0,23 \text{ cm}^3$  ( $1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$ )

(Alessandrini et al., 2008)

- Atemfrequenz der Maus:  $f = 475 \text{ min}^{-1} = 684000/24 \text{ Std}$  (Alessandrini et al., 2008)

- Alveoläre Depositionseffizienz:  $Dep = 20,4 \%$  (Alessandrini et al., 2008) für 35 nm Iridiumpartikel (Ir)

- Translokationseffizienz (nach 24 Stunden):  $Trans = 0,2 \%$  (siehe unten)

Die Translokationseffizienz ( $Trans$ ) ist ein Schätzwert, der auf den Translokationsmessungen von Semmler und Mitarbeiter (2004) und Kreyling und Mitarbeiter (2002) beruht. Diese Autoren fanden eine Translokationseffizienz von 1 % und 0,1 % (Massentranslokation) für Ir-Teilchen mit CMD = 15 nm bzw. 80 nm (in Ratten). Unter der Annahme, dass  $Trans$  hyperbolisch von CMD abhängt, finden wir durch Interpolation, dass für 48,9 nm große Partikel die Translokationseffizienz gleich 0,2 % ist. Aus den oben gegebenen Parametern bestimmt man die translozierte UfCP-Anzahl  $N_{Trans}$  gemäß

$$N_{Trans} = n \times V_{inhal} \times Dep \times Trans, \quad (\text{X1})$$

wobei das inhalierte Luftvolumen pro Tag gegeben ist durch  $V_{inhal} = V_T \times f = 157320 \text{ cm}^3$  und somit  $N_{Trans}$  gleich  $4,0 \times 10^8$  UfCP ist. Analog ergibt sich aus Gleichung X1 die translozierte UfCP-Masse, nämlich 28 ng und damit eine BET-Oberfläche von  $22 \text{ mm}^2$  (massenspezifische BET-Oberfläche von UfCP ist  $800 \text{ m}^2/\text{g}$  (Stoeger et al., 2006)). Diese Werte sind Grundlage des systemischen Dosisvergleiches von translozierten UfCP der Inhalation und der systemischen Infusion von UfCP.

### 3.2.1.3 Intraarterielle Infusion

Der Grund für die Wahl dieser Applikationsmethode ist, dass die intraarteriell infundierten UfCP einen vergleichbaren arteriellen Weg in der Blutzirkulation zurücklegen, so wie es nach der Inhalation bei den translozierten Partikeln der Fall ist. In der vorangegangenen Arbeit von Khandoga und Mitarbeiter (2004) wurde 2 Stunden nach der intraarteriellen Infusion von  $5 \times 10^7$  ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln prothrombotische Effekte in der hepatischen Mikrozirkulation detektiert. Um hinsichtlich unserer geplanten Gen- und Proteinexpressionsanalyse möglichst im Peak-Bereich der vorausgesetzten transkriptionellen Aktivierung und Proteinbiosynthese zu liegen, wurde der Untersuchungszeitpunkt auf 4 Stunden nach der UfCP-Infusion gelegt. Es wurde davon ausgegangen, dass sich die entzündlichen bzw. prothrombotischen Effekte mit zunehmender Zeitverzögerung stärker ausprägen.

#### 3.2.1.3.1 Versuchsaufbau

In der vorliegenden Studie wurden die Versuchsmäuse entsprechend der Methode von Khandoga und Mitarbeiter (2004) mittels einer intraarteriellen, systemischen Infusion von entweder mit den in Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) suspendierten UfCP oder mit „reinem“ KHP, d.h. ohne UfCP zur Kontrolle exponiert. Die für die Inhalation verwendeten funkengenerierten UfCP sind in wässriger Lösung nicht stabil (sie formen große Agglomerate und fällen aus) und sind somit ungeeignet für die intraarterielle Infusion. Aus diesem Grund wurden für die intraarterielle Infusion Printex 90 Partikel (Degussa) verwendet, die umgekehrt nicht in genügend großer, stabiler Konzentration aerosolisiert werden können und damit nicht inhalierbar gemacht werden konnten. Beide Arten von UfCP sind sich in ihrer chemischen Zusammensetzung jedoch sehr ähnlich. Printex 90 Partikel bestehen über 98 % aus elementarem Kohlenstoff und besitzen einen primären Partikeldurchmesser von 14 nm. Zum Vergleich bestehen die funkengenerierten UfCP über 95 % aus elementarem Kohlenstoff und besitzen einen Primärpartikeldurchmesser von 7 - 12 nm (Matuschek et al., 2007; Stoeger et al., 2006).

### 3.2.1.3.2 Bestimmung der zu infundierenden Partikelkonzentration

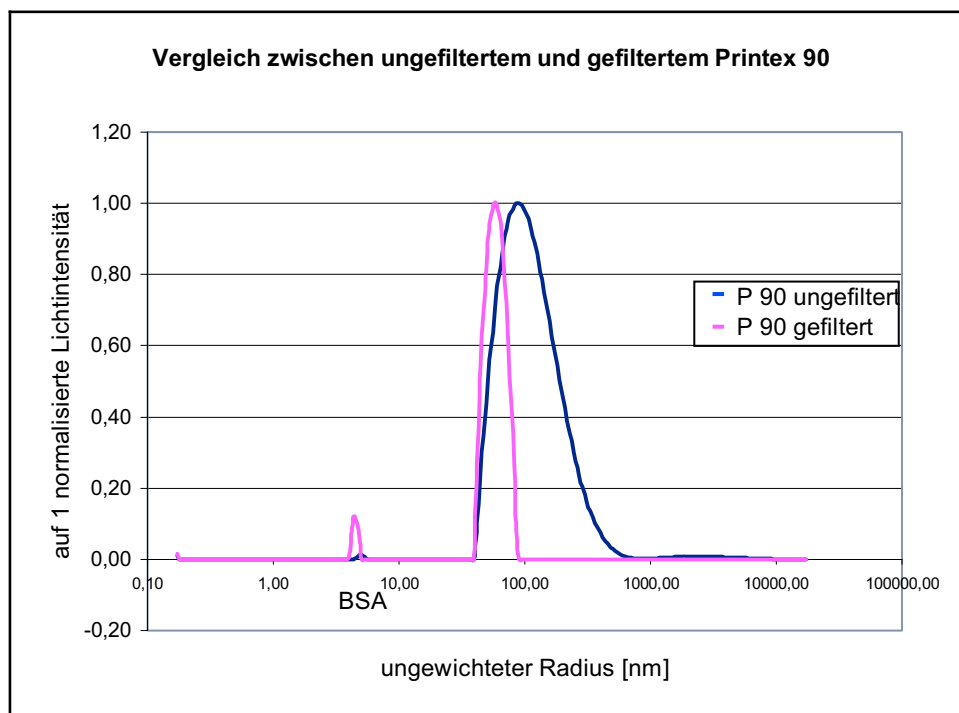
Die Vergleichbarkeit der biologischen Antwort des Mausmodells nach inhalativer und intraarterieller UfCP-Exposition setzt die Vergleichbarkeit der translozierten mit der infundierten Partikeldosis voraus. Für sechs verschiedene Kohlenstoffpartikel (einschließlich der hier verwendeten Partikel) wurde kürzlich gezeigt, dass die applizierte BET-Partikeloberfläche sehr gut ( $R^2 = 0.98$ ) mit den akuten entzündlichen Reaktionen in der Lunge korreliert, unabhängig von der Art der Partikel (Stoeger et al., 2006; 2007). Deswegen wurde die infundierte BET-Oberfläche der UfCP so gewählt, dass sie der translozierten (Inhalation) Partikeloberfläche ( $22 \text{ mm}^2$ ) entspricht. In der infundierten Suspension kann aus technischen Gründen nur die Anzahl der etwa 100 nm großen UfCP-Agglomerate bestimmt werden (siehe unten). Deswegen muss die gewünschte BET-Oberfläche der infundierten UfCP ( $22 \text{ mm}^2$ ) in die entsprechende Agglomeratanzahl umgerechnet werden. Dafür wurde zunächst die entsprechende Masse errechnet (73 ng; Printex 90 hat eine massenspezifische BET-Oberfläche von  $300 \text{ m}^2/\text{g}$ ) und dann die Anzahl der Agglomerate ( $N_{\text{agg}}$ ) aus dem Verhältnis von Gesamt- ( $M = 73 \text{ ng}$ ) zu Agglomeratmasse ( $M_{\text{agg}}$ ) bestimmt,

$$N_{\text{agg}} = M / M_{\text{agg}}, \quad (\text{X2})$$

wobei  $M_{\text{agg}} = N_{\text{pp}} \times M_{\text{pp}}$  ( $N_{\text{pp}}$ : Anzahl der kugelförmigen Primärpartikel pro Agglomerat;  $M_{\text{pp}}$ : Maß eines Primärpartikels) ist. Aus dem Produkt von Volumen ( $\pi \times d_{\text{pp}}^3 / 6$ ;  $d_{\text{pp}} = 14 \text{ nm}$ ) und Dichte der Primärpartikel (Dichte von Kohlenstoff ist  $2 \text{ g/cm}^3$ ) ergibt sich  $M_{\text{pp}} = 2,9 \times 10^{-18} \text{ g}$ . Die Anzahl der Primärpartikel pro Agglomerat kann man gemäß  $N_{\text{pp}} = k_f \times (d_{\text{agg}} / d_{\text{pp}})^{D_f}$  (Dobbins et al., 1994) abschätzen, wobei  $d_{\text{agg}}$  der Mobilitätsdurchmesser des Agglomerates (hier 100 nm, siehe unten), die fraktale Dimension  $D_f$  gleich 2,3 und die Konstante  $k_f$  gleich 3,1 ( $= 9 / 1,6^{D_f}$ ; Dobbins et al., 1994; Gwaze et al., 2006) ist. Damit ergibt sich aus Gleichung X2 eine Agglomeratanzahl von  $N_{\text{agg}} = 9,0 \times 10^7$ . Dieser Wert ist etwa doppelt so hoch, wie die von Khandoga und Mitarbeiter (2004) abgeschätzte obere Grenze für die tägliche Translokation von Umgebungsaerosol ( $5 \times 10^7$  Partikel). Da dies jedoch im Rahmen der Genauigkeit unserer Abschätzung des Zusammenhangs zwischen BET-Oberfläche und Agglomeratanzahl (ca. Faktor 2) mit der höheren der beiden von Khandoga und Mitarbeiter (2004) verabreichten Dosen ( $5 \times 10^7$  UfCP) übereinstimmt, haben wir uns entschlossen  $5 \times 10^7$  UfCP je Maus (entspricht  $8 \text{ mm}^2$  BET-Oberfläche) zu infundieren, um eine direkte Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von Khandoga und Mitarbeiter (2004) zu gewährleisten.

### 3.2.1.3.3 Herstellung ultrafeiner Kohlenstoffpartikelsuspensionen

Teilchen, die im Herstellungsprozess noch ultrafein waren, neigen bei Kontakt miteinander zur Agglomeration. Dieser Effekt tritt besonders auf, wenn man versucht, diese Teilchen in Suspension zu bringen. Vor allem hydrophobe Teilchen, aber auch hydrophile, müssen, wenn sie verklumpt sind, mit großem Energieaufwand wieder voneinander getrennt werden. Zur Herstellung der zur intraarteriellen Infusion verwendeten ultrafeinen Partikelsuspension wurden 1 mg Partikel in 5 ml Infusionslösung (Krebs-Henseleit-Puffer) eingewogen. Um entstandene Agglomerate aufzubrechen, wurde diese Suspension mit der Mikrospritze einer Ultraschalllanze bei einer Eingangsleistung von 40 Watt zweimal eine Minute beschallt. Die Beschallungen wurden durch eine einminütige Pause getrennt. Während der ganzen Zeit befand sich die hergestellte Suspension in Eiswasser, um thermische Schäden an in der Partikelsuspension enthaltenen Rinderserumalbumin (0,5 % BSA) zu verhindern. Damit die noch vorhandenen großen Agglomerate abgetrennt werden konnten, wurde die Partikelsuspension nach dem Ultraschallen erst durch einen 220-nm- und anschließend durch einen 100-nm-Spritzenvorsatzfilter (Millipore) gefiltert. Nach den beiden Filtrationsschritten wurde die Größenverteilung der Partikel und deren Agglomerate in der Suspension mittels eines *particlesizers* (Malvern HPPS) bestimmt. Es wurde überprüft, ob nur Partikel und Agglomerate kleiner 100 nm Durchmesser darin enthalten waren (Abbildung 4).

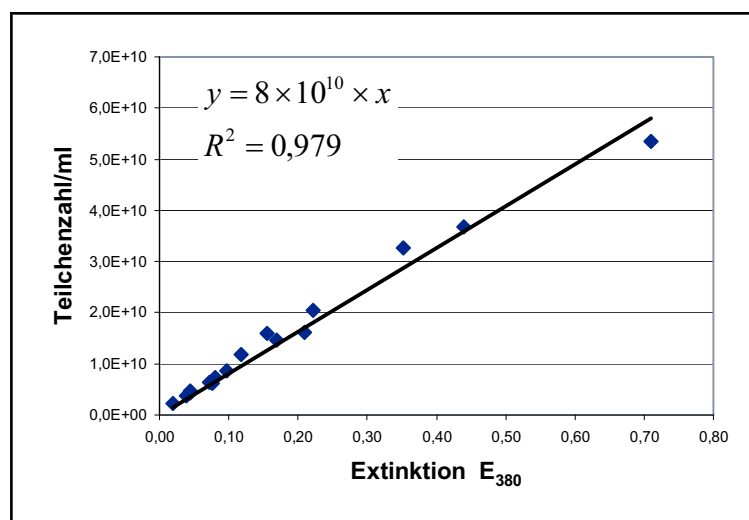


**Abbildung 4:** Malvern-Größenverteilungskurve mit einer ungefilterten (blau) und gefilterten (rosa) Suspension mit Printex 90

Der *particlesizer* strahlt Laserlicht in eine Küvette mit der Teilchensuspension und bestimmt die Teilchengröße durch Analyse der Intensitätsschwankungen des Lichts, das durch die in der Suspension enthaltenen Teilchen wieder rückgestreut wird. Je größer ein Teilchen ist, desto höher ist die Lichtintensität des rückgestreuten Lichts. In Abbildung 4 kann man erkennen, dass die Suspension nach dem Ultraschall ohne Filterung noch Agglomerate mit einer Größe von mehr als 100 nm enthielt. Nach dem Filtrieren sind diese Agglomerate jedoch nicht mehr nachweisbar. Das zur Stabilisierung der ultrafeinen Teilchen verwendete BSA wird mit einem Radius von 3,5 nm am Malvern HPPS gemessen. In der Abbildung 4 ist auf der Ordinate die Lichtintensität dargestellt. Der BSA-Peak ist nach dem Filtrieren größer als vorher. Der Grund dafür liegt darin, dass die großen Agglomerate nach der Filtration in der Suspension fehlen und dadurch die gesamte rückgestreute Lichtintensität von Printex 90 im Gesamtverhältnis geringer geworden ist.

#### 3.2.1.3.4 Bestimmung infundierter UfCP-Anzahl

Für die Bestimmung der Partikelanzahl einer ultrafeinen Partikelsuspension, deren Masse nach der Filtration nicht mehr aus der Einwaage abgeleitet werden kann, wurde eine von Andreas Stampfl erstellte Geradengleichung verwendet, die die lineare Beziehung zwischen der Anzahl der Printex 90 Partikel und der Lichtextinktion durch die Partikelsuspension verwendet (Khandoga et al, 2004).



**Abbildung 5:** Kalibrierkurve für Printex 90-Agglomerate mit 100 nm Durchmesser (nach Andreas Stampfl; Khandoga et al., 2004)

Für jede infundierte Probe wurde nach der Überprüfung am *particlesizer* (Malvern), ob der



Durchmesser der Partikelagglomerate kleiner als 100 nm war (Abbildung 4) mit einem Fotometer die Partikelanzahl anhand der gemessenen Lichtextinktion mittels der in Abbildung 5 dargestellten Kalibrierkurve bestimmt. Die für das jeweilige Experiment gewünschte Teilchenzahl wurde durch die entsprechende Verdünnung der Suspension erreicht. Die Teilchenkonzentration wurde so eingestellt, dass 50 µl der ultrafeinen UfCP-Suspension  $5 \times 10^7$  UfCP enthielten. Für das Infusionsexperiment wurde meist ein Partikelsuspensionsvolumen von 2 ml hergestellt.

### 3.2.1.3.5 Versuchsdurchführung (chirurgische Operation)

Die Anästhesie der Versuchsmäuse erfolgte mit einer Narkoselösung bestehend aus 1 ml Ketavet 100 [100 mg/ml], 0,1 ml Rompun 5 % [50 mg/ml] und 6 ml physiologischer Kochsalzlösung [0,9 % NaCl]. Von der Narkoselösung wurden dabei 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht *intra peritoneal* verabreicht. Zusätzlich wurde zur Schmerzlinderung Fentanyl subcutan verabreicht [0,5 µg Fentanyl pro 10 g Körpergewicht]. Zum Schutz der Cornea vor Austrocknung wurde Bepanthen® Augensalbe (Bayer) aufgetragen. Bei der Durchführung der folgenden beschriebenen Präparationsschritte befand sich das Versuchstier in Rückenlage auf einer 37 °C temperierten Heizplatte. Der Halsbereich wurde rasiert und mit 70 % Alkohol desinfiziert. Nach erfolgtem medianem Schnitt im Halsbereich und Wundspreizung wurden die Speicheldrüsen nach cranial mobilisiert. Die *Carotis externa* wurde links neben der *Trachea* stumpf frei präpariert. Die *Carotis* wurde kopfwärts ligiert. Herzwärts wurde eine Ligatur locker gelegt, um zunächst das Gefäß anzuheben und um die Spannung zu halten, und um später nach Applikation die *Carotis* abbinden zu können. Cranial wurde das Gefäß abgeklemmt. Mit einer um 90° im Spitzenbereich umgebogenen Kanüle (Sterican Z0,3 × 12 mm, Braun) wurde das Gefäß eröffnet und angehoben. Dabei diente die Kanüle gleichzeitig als Einführungshilfe für den Katheter. Der Katheter mit einem Außendurchmesser von 0,61 mm und einem Innendurchmesser von 0,28 mm (Portex) wurde bis zur Klemme eingeführt und mit einer weiteren Ligatur fixiert. Anschließend erfolgte nach dem Lösen der Klemme die Infusion. Es wurde entweder nur 200 µl Krebs-Henseleit-Infusionslösung (zur Kontrolle) oder die in diesem Volumen enthaltene Partikellösung, die mittels einer T-Stück-förmigen Apparatur zugegeben wurde, verwendet. Die Applikation der Partikellösung wurde wie folgt durchgeführt: An die vollständig mit KHP-Lösung gefüllte T-Stück Apparatur (Katheter, T-Stück und Spritze mit KHP-Lösung) wurde eine zweite Spritze mit UfCP-KHP-Lösung angeschlossen. 50 µl der hergestellten UfCP-KHP-Lösung enthielten  $5 \times 10^7$  UfCP. Demnach wurden zunächst unter Berücksichtigung des mit KHP-Lösung gefüllten Totraumvolumens (54,5 µl) des T-Stücks

104,5  $\mu$ l UfCP-KHP-Lösung infundiert und anschließend mit 95,5  $\mu$ l KHP-Lösung nachgespült. Dabei verbleiben 54,5  $\mu$ l der UfCP-KHP-Lösung im Totraum des T-Stücks. Das anschließende Nachspülen gewährleistete die vollständige Infusion der Partikellösung, da das Totraumvolumen des Katheters und der Aorta kleiner ist (ca. 26  $\mu$ l). Nach der erfolgten Infusion wurde das Gefäß mit der locker gelegten Ligatur abgebunden und der Katheter wieder entfernt. Schließlich wurden die mobilisierten Speicheldrüsen wieder anatomisch korrekt zurückverlagert und die Wunde vernäht. Während der gesamten Präparation wurde besonders auf die Schonung der umliegenden Strukturen, wie z.B. den *Truncus vagosympathicus* und den *N. phrenicus* geachtet. Dabei wurde regelmäßig das Operationsfeld mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet. Nach der OP wurde nochmals Fentanyl wie präoperativ subcutan verabreicht. Die Mäuse verblieben zum Erwachen in einer sterilen Käfigbox, bis sie schließlich 4 Stunden nach erfolgter Infusion der Partikel unter Narkose und Blutentnahme eingeschläfert wurden.

### Berechnungen

- Totraumvolumen des T-Stücks:

*T-Stück leer: 2,6373 g*

*T-Stück gefüllt, Spritze aufgesetzt und abgezogen: 2,6918 g*

*Differenz: + 54,5 mg = 54,5  $\mu$ l Totraumvolumen*

- Totraumvolumen des Katheters:

*Katheter: 20 cm lang, 0,4 mm Innendurchmesser;  $Q = r = 0,2$  mm*

*Zylindervolumen:*

$$V = \pi \times r^2 \times h = \pi \times (0,2 \text{ mm})^2 \times 200 \text{ mm} = 25 \text{ mm}^3 = 25 \mu\text{l}$$

*oder 25  $\mu$ l je 20 cm Katheter*

- Totraumvolumen der Carotis bis Aortenbogen:

*Die Gefäßlänge von ca. 10 mm, mit einem abgeschätzten Innendurchmesser des Gefäßes von ca. 0,4 mm entsprechen einem Totraumvolumen von etwa 1,25  $\mu$ l.*

- UfCP-KHP-Lösung (infundiert):

*50  $\mu$ l der hergestellten UfCP-KHP-Lösung enthielten  $5 \times 10^7$  UfCP. Unter Berücksichtigung des Totraumvolumens des T-Stücks wurden entsprechend 104,5  $\mu$ l der Partikellösung appliziert und mit Pufferlösung nachgespült.*

*UfCP-KHP-Lösung: 50  $\mu$ l UfCP-KHP-Lösung + 54,5  $\mu$ l Totraumvolumen = 104,5  $\mu$ l*

### 3.2.2 Aufarbeitung der Versuchstiere

#### 3.2.2.1 Narkose zur Einschläferung

Direkt nach Beendigung der Expositionen wurden die Tiere durch Applikation einer Narkosemischung nacheinander eingeschläfert. Die Anästhesie wurde durch eine intraperitoneale Injektion einer Narkoselösung von 25 µl pro 10 g Körpergewicht erreicht. Der Mix bestand aus 10 ml Ketavet100 [100 mg/ml], 0,22 ml Rompun 5 % [50 mg/ml] (TS 500 mg, Bayer).

#### 3.2.2.2 Blutentnahme

Die Blutentnahme wurde mit EDTA-Glaskapillaren (Sarstedt) durch eine Punktion des retrobulbären Venenplexus durchgeführt (Andre et al., 2006). Die ersten 0,4 - 0,5 ml Blut wurden in einem EDTA-Röhrchen (Sarstedt) aufgefangen und geschwenkt. Das restliche Blut (0,3 - 0,5 ml) wurde zur Serums- oder Plasmagewinnung mit einer Monovette (Sarstedt) aufgefangen, bei Raumtemperatur zum Gerinnen für mindestens 30 min stehen gelassen und bei 1400 g ( $g$  = Erdbeschleunigung) für 15 min zentrifugiert. Das Serum, das sich als klare bernstein-gelbe Flüssigkeitssäule darstellte, wurde abpipettiert und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei minus 20 °C gelagert. Hinsichtlich der noch folgenden Gen- und Proteinexpressionsanalysen von Geweben wurde darauf geachtet, den störenden Einfluss von Blutzellen und Blutproteinen möglichst auszuschließen. Dies wurde mit einer vollständigen Entblutung des Tieres gewährleistet, indem die Bauchhöhle in der *Linea alba* eröffnet und die *Aorta abdominalis* und die *Vena cava caudalis* durchtrennt wurden.

#### 3.2.2.3 Bronchoalveoläre Lavage

Zur Durchführung der bronchoalveolären Lavage (BAL) wurde anschließend das Zwerchfell der Mäuse punktiert, sodass die Lunge kollabieren konnte und die darin enthaltene Luftmenge reduziert wurde. Danach wurde die Haut vom Unterkiefer bis zum Brustbein durchtrennt und die *Trachea* durch Verlagerung und Entfernen der sie bedeckenden Organe und Gewebe freigelegt. Zwei bis drei Trachealringe kaudal des Kehlkopfes wurde ein Kunststoffkatheter in die *Trachea* eingeführt und durch zwei Ligaturen in der *Trachea* fixiert. Zum Lavagieren wurde eine PBS-Lösung (Seromed, Biochrom) bei Raumtemperatur in einem 500-ml-Behälter mit Durchstechstopfen verwendet. Dieser Behälter wurde über ein Infusionsbesteck (Original-Infusomat-Leitung, Braun-Melsungen) und einen Dreiwegehahn (Discofix, Braun-Melsungen) mit dem Kunststoffkatheter verbunden. Der Flüssigkeitsspiegel wurde auf 50 cm ange-

hoben und der Schlauch mit der Spülflüssigkeit gefüllt. An der dritten noch freien Verbindung am Dreiwegehahn wurde eine leere 2 ml Spritze (Braun-Melsungen) befestigt. Um die Lunge mit der Spülflüssigkeit zu füllen, wurde nun nach Öffnen des Hahnes zwischen PBS-Behälter und Kunststoffkatheter tropfenweise Flüssigkeit in die Lunge gegeben. Nach Füllung der Lunge bis zu einem Gesamtvolumen von etwa 0,5 ml wurde dann der Thorax der Maus sanft zwischen Daumen und Zeigefinger massiert, um eine bessere Verteilung der Flüssigkeit und eine höhere Zellausbeute zu erreichen. Nach ca. zehn Sekunden wurde nach Umstellung des Dreiwegehahnes auf die Verbindung Lunge-Spritze mit der aufgesteckten 2 ml Spritze vorsichtig die Spülflüssigkeit aspiriert und in bereitgestellte Gefäße gegeben. Diese Spülung wurde zehnmal hintereinander durchgeführt. Die ersten zwei Lavagen wurden separat in einem 5-ml-Reaktionsgefäß (Falcon, Becton Dickinson) für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration verwendet. Die acht folgenden Lavagen wurden zur Zellzahlbestimmung in einem 15-ml-Reaktionsgefäß (Falcon, Becton Dickinson) gesammelt. Beide Falcon-Gefäße wurden bei 425 g ( $g$  = Erdbeschleunigung) für 20 min und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die weiteren Untersuchungen wurde der Überstand des 5-ml-Falcon in drei 1,5-ml-Eppendorf-Gefäße für die Messung der Gesamtproteinkonzentration aufgeteilt. Das Volumen und die Farbe des Zellpellets wurden notiert.

Für den Zeitraum bis zur Weiterverarbeitung der Zellen wurde das Zellpellet des 5-ml-Falcon in 1 ml Nährmedium aufgelöst. Um die Zellen aller zehn Fraktionen von BAL-Lösungen zu erhalten, wurde diese Zellsuspension in das 15-ml-Falcon übertragen, auf einem Schüttler gut gemischt und bei Raumtemperatur für maximal 1 Stunde gelagert.

#### **3.2.2.4 Organentnahme**

Den Versuchsmäusen wurden die Lunge, das Herz, die Aorta und die Leber präpariert und sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren, für die folgenden Untersuchungen separat in 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.2.3 Untersuchung biologischer Endpunkte**

#### **3.2.3.1 Klinisch-chemische Parameter der BAL-Lösung**

##### **3.2.3.1.1 Gesamtzellzahl**

Die Gesamtzellzahl der BAL-Spülflüssigkeit wurde unter Verwendung eines Hämozytometers nach Neubauer ermittelt. Durch die Färbung mit Trypanblau wurden gleichzeitig auch tote Zellen erfasst. Diese waren an ihrer durchgehend blauen Färbung erkennbar, die durch das

Eindringen des Farbstoffes in Zellen mit geschädigter Zellmembran zustande kommt. 20 µl Zellsuspension wurden mit 80 µl Trypanblaulösung versetzt und gründlich durchmischt. Mit dieser Lösung wurde eine Kammer des Hämozytometers gefüllt und die Zellen bei 40-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Leitz Diaplan, WILD Leitz AG) ausgezählt. Es wurden alle vier Quadranten ausgezählt und daraus der Mittelwert bestimmt. Um die Zellzahl pro ml Medium zu erhalten, musste der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden. Die absolute Gesamtzellzahl wurde ermittelt, indem die Zellzahl pro ml Medium mit dem tatsächlichen Volumen der BAL-Spülflüssigkeit multipliziert wurde.

#### **3.2.3.1.2 Zelldifferenzierung**

Zur Zelldifferenzierung der BAL-Zellen wurden je 4 Zytospins angefertigt. Hierzu wurden je 75.000 Zellen der Lavagezellsuspension in einer Zytozentrifuge (Zytospin 2, Shandon) für 6 min bei 400 U/min zentrifugiert. Die Zellen wurden auf einem mikroskopischen Objektträger (Assistent) innerhalb einer begrenzten Auftragsfläche aufgetragen. Die Zytospins wurden luftgetrocknet und wie folgt weiterverarbeitet: Ein Zytospin pro Tier wurde zur weiteren Verarbeitung für 10 min in Aceton fixiert und bei -80 °C eingefroren, ein weiterer Zytospin wurde für jedes Tier unbehandelt bei -80 °C eingefroren. Zwei Zytospins wurden noch am selben Tag gefärbt. Hierfür wurden die Objektträger für 10 min in konzentrierte May-Grünwald-Lösung (Merck), danach für 2 min in Leitungswasser, dann für 15 min in 1:20 mit Leitungswasser verdünnte Giemsa-Lösung (Merck) und zuletzt für 2 min in Leitungswasser gestellt. Die Objektträger wurden über Nacht getrocknet und am nächsten Tag zum Schutz mit Deckgläsern unter Verwendung von Klebstoff (Entellan) eingedeckelt, der wiederum über Nacht trocknen musste.

#### **3.2.3.1.3 Gesamtprotein**

Das Gesamtprotein der BAL-Lösung setzt sich aus sezernierten Proteinen, Zelltrümmern und bei Vorliegen einer Schädigung der Blut-Luft-Schranke auch aus Blutbestandteilen zusammen. Den größten Anteil am Gesamtprotein hat Albumin. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Für die Untersuchung des Gesamtproteins wurde der Protein-Assay von Bio-Rad verwendet (3.2.3.3.2).

### 3.2.3.2 Genexpressionsanalyse

Um eine nähere Einsicht in die veränderten Genexpressionen der untersuchten Organe zu erhalten, die durch die Partikelexposition verursacht werden, wurde von Lungen-, Herz-, Aorta- und Lebergewebe eine mRNA-Expressionsanalyse via quantitativer RT-PCR am ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die cDNA von 4 Tieren je experimenteller Gruppe wurden zunächst gepoolt und dann für die Analyse eingesetzt. Das Vielfache der Induktion (*fold induction*) wurde mittels der ddCT-Methode berechnet und auf HPRT normiert (Livak und Schmittgen, 2001). Die Sequenzen der genspezifischen Primer sowie weitere Informationen sind auf Seite 141 in Tabelle A1 zu finden. Der Fokus dieser Untersuchung lag auf ausgewählten Genen, die für Proteine codieren, welche in *pathways* von entzündlichen Stressreaktionen involviert sind. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass diese *pathways* durch die Exposition von ultrafeinen Partikeln getriggert werden (Andre et al., 2006; Sasmono et al., 2007; Frampton et al., 2006; Khandoga et al., 2004; Salvi et al., 1999; 2000; Ulrich et al., 2002; Sun et al., 2005). Die Gene wurden in folgende Kategorien eingeteilt: Epithel- und Endothelaktivierung (Adhäsionsmoleküle, Gefäßmotorik, Gerinnungsmarker), Leukozyten (zellspezifische Marker für die Invasion bzw. Akkumulation von Leukozyten wie Monozyten bzw. Makrophagen und neutrophilen Granulozyten), Entzündungsmediatoren (Zytokine) und oxidativer Stress (Seite 68, Abbildung 10).

Abgesehen von der Lunge, lag das Augenmerk dieser Analyse auf den sekundären Zielorganen wie zum Beispiel dem Herz, der Aorta und der Leber. Das Herz und die Aorta wurden primär als repräsentative Zielorgane für kardiovaskuläre Effekte ausgewählt. Die Leber wurde ausgewählt, da sie (1) eine große Rolle in der Clearance von zirkulierenden Partikeln spielt (via Phagozytose durch das retikuloendotheliale System), (2) für inhalierte, ultrafeine Partikel die Translokation in die Leber gezeigt werden konnte (Semmler et al., 2004), (3) die Leber als hauptsächliches Organ angesehen wird, welches für die Synthese von Akute-Phase-Proteinen verantwortlich ist und (4) die hepatische Mikrozirkulation (Kapillaren) durch die systemische UF-CP-Exposition betroffen zu sein scheint (Khandoga et al., 2004).

#### 3.2.3.2.1 Isolation von RNA aus Mausgewebe (QIAGEN RNeasy Mini Kit)

Für die Isolierung der gesamten RNA aus dem Mausgewebe wurden die tiefgefrorenen Gewebeproben (3.2.2.4) in Lysing Matrix Gefäße überführt und mit 1 ml TriFast<sup>®</sup> Reagenz versehen. Die jeweiligen Gewebe wurden durch das 2 × 30 s lange Schütteln bei Stufe 6 im FastPrep homogenisiert. Dann wurden die Gefäße bei 2 °C und 13000 rpm für 1 Minute zen-

trifugiert, um die Zelltrümmer zu pelletieren.

Der Überstand wurde in 467 µl TriFast® (Sigma) und 334 µl Chloroform (-20 °C) (Merck) überführt, für 10 s gevortext und für 10 min bei RT inkubiert, um die Separation der Phasen zu ermöglichen. Diese Mischung wurde bei 2 °C und 13000 rpm für 2 min zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Für die Fällung der Nukleinsäuren wurden 3 µl Glycogen (20 mg/ml, eiskalt), 396 µl NH<sub>4</sub>Ac 10 mM und 604 µl Iso-propanol (-20 °C) zugegeben und das Gefäß vorsichtig geschwenkt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei -20 °C wurde das Gefäß bei 2 °C, 13000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde einmal mit 2 ml 75 % Ethanol (-20 °C) gewaschen, bei 2 °C, 13000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Trocknen für bis zu 5 min ermöglicht. Für das Löslichmachen wurde 50 µl RNA-Stabilisationspuffer (Qiagen) zugegeben und die Lösung wurde mit 600 µl RLT-Puffer (Qiagen), der β-mercaptoethanol (Merck) enthielt, gemischt. Die Eppendorf-Gefäße wurden vorsichtig invertiert, 650 µl 70 % Ethanol hinzugefügt und wieder invertiert. Die Mixtur wurde auf Säulen transferiert und zentrifugiert, um die Nukleinsäuren auf die Silica-Membran zu binden und um Verunreinigungen zu entfernen. Die Membran wurde einmal mit 400 µl RW1-Puffer (Qiagen) gewaschen und dann in 80 µl DNaseI/RDD-Puffer (Qiagen) bei RT für 15 min inkubiert, um die genomische DNA zu verdauen. Anschließend wurden die Säulen mit 300 µl RW1-Puffer, dann ein erstes Mal mit 650 µl und ein zweites Mal mit 350 µl RPE-Puffer (Qiagen) gewaschen. Danach wurde das Gefäß bei RT 13000 rpm für 2 min zentrifugiert, um verbleibendes Ethanol zu entfernen. Schließlich wurde die RNA in 200 µl nucleasefreiem Wasser (Qiagen) eluiert. Ein Aliquot wurde für die Bestimmung der RNA-Konzentration und der Qualitätskontrolle verwendet. Die restliche RNA wurde bei -80 °C gelagert.

#### **3.2.3.2.2 Fotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration**

Die Messung erfolgte am NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Bei der fotometrischen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration nutzt man das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Bestimmt man das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm, lässt sich die Reinheit der Nukleinsäuren abschätzen. In einer reinen DNA- bzw. RNA-Lösung sollte der Quotient 260 nm / 280 nm zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Liegt eine Kontamination mit Proteinen vor, so ist dieser Wert kleiner. Eine Absorption bei 260 nm von 1,0 entspricht in einer DNA-Lösung 50 µg/ml, in einer RNA-Lösung 40 µg/ml.

### 3.2.3.2.3 Qualitätskontrolle der aufgereinigten RNA

Für die Qualitätskontrolle der aufgereinigten RNA-Eluate wurden 500 ng total RNA mit *Loading Dye* (Fermentas) in einem 1 % Agarosegel bei 75 V für 1 Stunde aufgetrennt. Dazu wurde eine *high range* RNA-Leiter (PeqLab) mit aufgetragen. Dabei wurde die Integrität der ribosomalen 28-S- und 18-S-Banden verglichen. Eine gute Qualität wurde erreicht, wenn die 28-S-Bande etwa doppelt so stark war im Vergleich zu der 18-S-Bande.

### 3.2.3.2.4 Reverse Transkription von RNA

Für die Herstellung von cDNA wurde 1 µg der gesamten RNA in nukleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt. Um die Denaturierung zu ermöglichen, wurden danach 1 µl Random-Nonamer-Primer zugegeben und bei 70 °C für 5 min erhitzt. Anschließend wurde 5 min auf Eis inkubiert, um die Primeranlagerung zu gewährleisten. Die RNA-Primer-Mixtur wurde dann bei RT für 10 min inkubiert. Die reverse Transkriptasemixtur wurde wie folgt hergestellt (Tabelle 3):

	<b>1 ×</b>
5 × First Strand Buffer (Invitrogen, Superscript-Kit)	4 µl
10 × DTT 0,1 M (Invitrogen, Superscript-Kit)	2 µl
Superscript II RT 200 U/µl (Invitrogen)	1 µl
RNAse Inhibitor 40 U/µl (Invitrogen)	1 µl
20 × 4dNTPmix 10 mM each (Invitrogen)	1 µl

**Tabelle 3:** Herstellung der Transkriptasemixtur

Die reverse Transkriptasemixtur wurde der RNA-Primer-Mixtur hinzugefügt und zunächst bei 42 °C für 60 min und dann bei 70 °C für 15 min inkubiert, um letztlich das Enzym zu inaktivieren. Nach der reversen Transkriptase wurden die Proben zentrifugiert und 1:20 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Danach wurde die cDNA bei -20 °C gelagert.

### 3.2.3.2.5 Quantitative Analyse der Genexpression mit RT-qPCR

Die *Real-Time-quantitative-PCR* (RT-qPCR) wird verwendet um die initiale Menge an *template*-DNA, üblicherweise cDNA, die man aus der reversen Transkription von mRNA erhalten hat, zu quantifizieren. Die Quantifizierung wurde mit dem “ABsolute™ QPCR SYBR®Green ROX Mix” (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.



Die Thermo-Start™ DNA-Polymerase ist eine *hot-start*-Polymerase, die bei 95 °C für 15 min aktiviert werden muss, damit bei der Anlagerung an die Proben bei niederen Temperaturen keine Elongation stattfindet, da Primer unspezifisch binden können.

Die Quantifizierung wird durch die Zugabe des fluoreszierenden Farbstoffes SYBR® Green in die Reaktionsmischung ermöglicht. Der Farbstoff weist ein starkes Fluoreszenzsignal auf, wenn dieser in die dsDNA bindet. Dabei nimmt die Fluoreszenz mit der Menge des amplifizierten Produktes während der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu. Die emittierte Fluoreszenz wird am Ende eines jeden Zyklus vom Thermocycler gemessen und mittels der Herstellersoftware (Applied Biosystems) werden die Fluoreszenzsignale gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Nach Beendigung der Reaktion wird ein *threshold cycle* (CT)-Wert berechnet, der die Zahl der Zyklen widerspiegelt, die notwendig ist, um eine bestimmte Menge des Produktes zu erhalten. Zusammen mit den Genen, die von Interesse waren, wurde das *housekeeping* Gen *Hprt* untersucht, welches am Purin-Metabolismus beteiligt ist. Da der Expressionslevel dieses Gens in verschiedenen Proben gleich bleiben sollte, wurde dessen CT für die Normalisierung der CT-Werte der Zielgene verwendet. Demnach wurden die  $\Delta$ CT-Werte wie folgt berechnet:

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{Hprt}$$

Um den Effekt von Abweichungen von Reaktionsmischung-Kompositionen zwischen Zielgenen und *Hprt* zu vermeiden, wie zum Beispiel von Primer- oder Polymerase-Konzentrationen, wurde eine interne Kontrolle verwendet, um die  $\Delta$ CT-Werte für jedes Gen zu normalisieren. Proben von zeitgleichen Kontrollmäusen im Vergleich zu exponierten Tieren dienten hier als Kontrollen. Die daraus resultierenden  $\Delta\Delta$ CT-Werte wurden wie folgt berechnet:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Exponiert}} - \Delta CT_{\text{Kontrolle}}$$

Da in der PCR jeder Amplifikationszyklus einer 2-fachen Zunahme des Produktes entspricht, entspricht ein  $\Delta\Delta$ CT-Wert von 1 einem 2-fachen Unterschied in der initialen *template* Konzentration. Demnach wird die *fold induction* eines Gens in Relation zu einer Kontrolle folgend berechnet:

$$\text{fold induction} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Der Reaktionsmix wurde wie in der folgenden Tabelle 4 beschrieben hergestellt.

	<b>1 ×</b>
ABsolute™ qPCR SYBR®Green ROX Mix	12,5 µl
nukleasefreies H <sub>2</sub> O (Gibco)	10,5 µl
Primer-Mixtur 5 µM <i>each</i>	1 µl
cDNA	1 µl

**Tabelle 4:** Herstellung der Reaktionsmischung

Nach kurzer Zentrifugation wurde der Reaktionsmix in dem folgenden PCR-Programm eingesetzt.

50 °C	2 min	1 × Zyklus
95 °C	15 min	1 × Zyklus
95 °C	15 s	40 × Zyklen
60 °C	1 min	

### 3.2.3.2.6 Primerpaar-Validierung

Um die Spezifität des PCR-Produktes zu bestätigen, wurden die Primerpaare in die *Real-Time-PCR* eingesetzt und die Amplifikationsprodukte wurden in einem 2 % Agarosegel bei 100 V für 1,5 Stunden aufgetrennt. Es wurde 5 µl der *ultra low range* DNA-Leiter (Fermentas) und die DNA-Amplifikat-Mixturen aufgetragen, den Letzteren wurde zuvor *loading dye* (Fermentas) zugegeben. Für die folgenden Analysen wurden nur Primer verwendet, deren Produkte die korrekte Größe im Gel ergaben und die zu erwarteten Schmelzkurven aufzeigten.

### 3.2.3.3 Untersuchungsmethoden auf Proteinebene

#### 3.2.3.3.1 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischem Gewebe

Für diese Untersuchungsmethode wurden die Proteinextrakte aus den Organen Lunge, Herz und Leber mittels eines Lyse-Puffers hergestellt, der zusätzlich den Protease-Inhibitor Cocktail III (Merck Chemicals) enthielt. Die jeweiligen Gewebe wurden durch das 2 x 30 s lange Schütteln in den *lysing matrix* Säulen bei Stufe 6 im *FastPrep* (Qbiogene) homogenisiert, danach wurden die Gefäße bei 2 °C und 13000 rpm für 1 min zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu pelletieren. Der proteinhaltige Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Die Proteinlysate von 4 Tieren je Gruppe wurden nach der Proteinkonzentration

onsbestimmung auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Für die weiteren Untersuchungen wurden gepoolte Proben eingesetzt und gegebenenfalls verdünnt.

#### 3.2.3.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mithilfe des Biorad-Proteinreagenz (Bio-Rad) durchgeführt. Die Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue G-250* an Proteine und die damit verbundene Blaufärbung, die zur Proteinkonzentration proportional ist. 5 µl Zelllysate wurden mit 995 µl Biorad Reagenz, welches im Verhältnis 1:5 mit aquadest verdünnt wurde, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Das Bio-Rad-Reagenz enthält neben *Coomassie Brilliant Blue G-250* noch Phosphorsäure und Methanol. Die Blaufärbung wurde spektralfotometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem *ELISA-Reader* (iEMS Reader MF, Dynex Hybaid Labsystems) gemessen und die Proteinmenge anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve quantifiziert. Als Standard wurde eine bovine Serumalbumin-Lösung (BSA) mit einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Herstellersoftware GENESIS II (Dynex Hybaid Labsystems) und MS Office Excel.

#### 3.2.3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Proteinextrakte (3.2.3.3.1) wurden mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Dazu wurde das Gel (NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris-HCL, Invitrogen) in die dafür vorgesehene Gelkammer (Xcell SureLock Mini-Cell, Invitrogen) eingespannt und diese mit *NuPAGE MOPS SDS Runningbuffer* (Invitrogen) gefüllt. Von den Proben wurden 20 µg mit 4 x SDS-Puffer (Invitrogen) versetzt. Zur Aufspaltung der Disulfidbrücken wurde *NuPAGE Sample Reducing Agent* (Invitrogen) hinzugegeben. Der Ansatz wurde 5 min auf 95 °C erhitzt, um Proteine zu denaturieren. Danach wurden sie zusammen mit einem Proteinmarker, der farblich markierte Proteine mit bekanntem Gewicht enthält, auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

#### 3.2.3.3.4 Westernblot-Analyse

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels *Semi-Dry*-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Westernblot nach Towbin et al., 1992). Dazu wurde das Trenngel in 1 x Transferpuffer 5 - 10 min äquilibriert. In 1 x Transferpuffer getränktes, extra dickes Filterpa-

pier wurde auf die Elektrode gelegt, darauf kamen die Nitrozellulosemembran, das Gel und ein weiteres getränktes Filterpapier. Der Transfer erfolgte 1,5 Stunden in der Nassblotkammer (Xcell II Blot Module, Invitrogen) bei 25 V.

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran 1 - 2 min mit PonceauS-Lösung (Sigma) gefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen. Überschüssiges PonceauS wurde mit Wasser abgespült. Anschließend erfolgte eine Immundetektion mit entsprechenden Antikörpern. Die transferierten Proteine können mittels spezifischer Antikörper auf der Nitrozellulosemembran nachgewiesen werden. Zuerst wurde die Membran 1 Stunde mit Block-Puffer geschüttelt, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen abzusättigen. Die Membran wurde dann dreimal mit PBS-T gewaschen. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem spezifischen Primär-Antikörper in Blocklösung inkubiert. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind in der nachfolgenden Tabelle 5 finden. Die Membran wurde anschließend dreimal 10 min wiederum mit PBS-T gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der Primär-Antikörper wurde durch einen sekundären Antikörper detektiert. Dieser war mit dem Enzym HRP (*horse redish peroxidase*) konjugiert und konnte somit durch eine Chemolumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht werden. Die Membran wurde dann 1 Stunde mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert und danach dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen.

Primär-Antikörper	Firma	Verdünnung
<i>rat anti-mouse Fibrinogen</i>	BD Bioscience, USA	1:7500
<i>rabbit anti-mouse CXCL 1(KC)</i>	Cedarlane, Kanada	1:1000
<i>mouse anti-mouse beta-Aktin</i>	Sigma-Aldrich, Deutschland	1:50000
<i>rat anti-mouse PCNA</i>	Santa Cruz, USA	1:50000

Sekundär-Antikörper	Firma	Verdünnung
<i>goat anti-rat IgG, HRP-linked</i>	Zymed, Deutschland	1:11000
<i>ECL donkey anti-rabbit IgG, HRP-linked</i>	GE Healthcare, UK	1:50000

**Tabelle 5:** Die zur Immunodetektion verwendeten Antikörper

Danach erfolgte der Chemolumineszenz-Nachweis, bei dem ein Röntgenfilm exponiert wurde. Verwendet wurde das ECL-Plus Detektionssystem (GE Healthcare). Die Membran wurde 5 min im Dunkeln mit 1:40 verdünntem ECL-Plus inkubiert. Die Flüssigkeit wurde vollstän-

dig entfernt, die Membran in eine Folie überführt und ein Röntgenfilm ausreichend exponiert (je nach Signalstärke 10 Sekunden bis 10 min) und entwickelt.

Die Filme wurden anschließend eingescannt und mit dem Programm *Syngene Software Image* (Cambridge, UK) eingelesen und densitometrisch ausgewertet. Dabei wurde die *baseline* Korrektoreinstellung „*rolling disc*“ verwendet. Die Proteinexpressionen bzw. die quantifizierten Intensitäten aus den zugehörigen Banden wurden auf die Beta-Aktin- bzw. PCNA-Banden (Ladekontrolle) normalisiert und als vielfache Veränderung relativ zu den entsprechenden Kontrollen dargestellt.

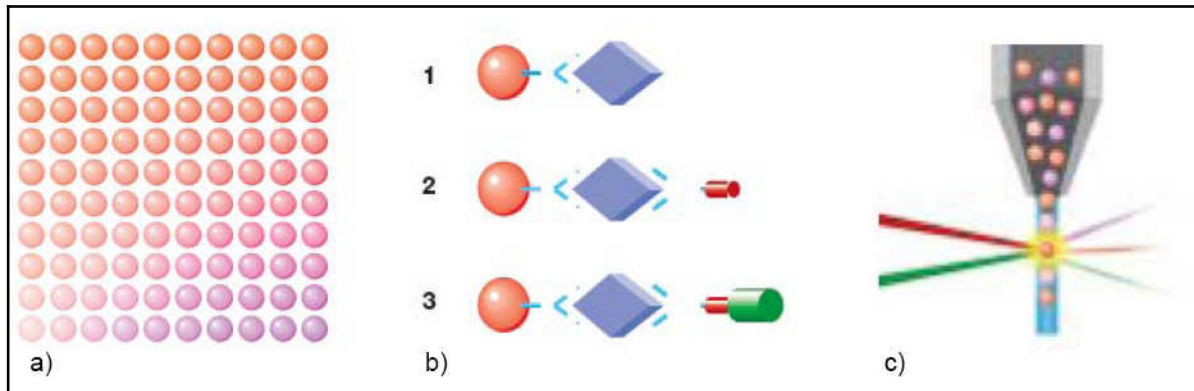
### 3.2.3.3.5 *Searchlight-Multiplex-Proteinexpressionsanalyse*

Die gepoolten und auf eine bestimmte Konzentration eingestellten Proteinlysate unterschiedlicher Gewebe wurden für die folgende Untersuchung eingesetzt (3.2.3.3.1). Für die Proteinexpressionsanalyse wurde der *SearchLight® Proteome Array* gewählt (Thermo Fisher Scientific). Der *SearchLight Proteome Array* ist ein quantitativer *multiplex-sandwich* ELISA, der bis zu 12 verschiedene gespottete *capture*-Antikörper auf dem Boden jedes *well*s einer 96-*well*-Polystyren-Mikrotiterplatte enthält. 34 Proteinanalyte, die auf Seite 70, Abbildung 11 aufgeführt sind, wurden von dem *SearchLight Menu of Assays*: <http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=4374727D-BA29-45DB-88C82B72715DAF6A> ausgewählt. Der Fokus dieser Untersuchung lag auf ausgewählten Proteinen, die an entzündlichen Stressreaktionen beteiligt sind. Die Proteine wurden in folgende Kategorien eingeteilt: Epithel- und Endothelaktivierung (Adhäsionsmoleküle), Leukozyten (zellspezifische Marker für die Invasion bzw. für die Akkumulation von Leukozyten wie Monozyten bzw. Makrophagen und neutrophilen Granulozyten) und Entzündungsmediatoren (Zytokine) (Seite 70; Abbildung 11).

### 3.2.3.3.6 *Multiplex-Suspension-Protein-Array-System zur Quantifizierung von Zytokinen (Mediatoren)*

Zur Quantifizierung der von uns untersuchten Zytokine wurde das *Multiplex-Suspension-Protein-Array-System* der Firma Bio-Rad, mit welchem simultan bis zu 100 verschiedene Proteine in einer einzigen Kavität einer 96-Loch-Mikrotiterplatte analysiert werden können (Abbildung 6), verwendet. Das Prinzip funktioniert analog eines modifizierten Sandwich-Immunoassays. Hierbei sind verschiedene monoklonale zytokinspezifische Antikörper kovalent an unterschiedlich fluoreszenzmarkierte *beads* (Abbildungen 6a und 6b) gebunden (ana-

log zur Fixierung auf einer Mikrotiterplatte). Ein biotinylierter Detektionsantikörper ist gegen die jeweiligen Epitope der zu messenden Zytokine gerichtet (Abbildung 6b). Nach Zugabe von Streptavidin- Phycoerythrin (PE), das an den biotinylierten Antikörper bindet, findet die Messung nach dem durchflusszytometrischen Prinzip statt (Abbildungen 6b und 6c).



**Abbildung 6:** Das Prinzip des *Multiplex-Suspension-Protein-Array-Systems*

Mittels einer Kanüle wird jeweils ein kleines Volumen aus der Probe aufgenommen und zu einer Durchflusszelle geleitet, welche die *beads* einzeln in einem gleichmäßigen Strom durchfließen lässt. Hierbei werden die Polystyrolkügelchen (Durchmesser 5,5  $\mu\text{m}$ ) an zwei verschiedenen Lasern vorbeigeleitet. Während der erste „rote“ Laser durch Anregung der *beads* (635 nm) letzten Endes die Zytokine klassifiziert und sich die Zytokinmenge durch die Anregung der PE-Moleküle (zweiter „grüner“ Laser, 532 nm) definiert, wird die gebundene Menge der jeweiligen Zytokine aufgrund ihrer Fluoreszenzintensität quantifiziert (Abbildung 6). Anhand der Fluoreszenzsignale werden die unbekannten Zytokinmengen mittels einer Standardkurve durch *Bioplex-Manager-Software* (Bio-Rad) berechnet. Auf diese Weise kann man bis zu 100 Zytokine gleichzeitig in einer Probe messen.

### 3.2.3.3.6.1 *Bioplex-Zytokinkonzentrationsbestimmung*

Zur Quantifizierung von Zytokin-Konzentrationen in den BAL-Lösungs- und den Plasmaproben diente das *Multiplex-Suspension-Protein-Array-System*. Die Anwendung des Luminex 100 Gerätes (Bio-Rad) und des *Bioplex-Protein-Array-Systems* (BioPlex Mouse Cytokine Array, Bio-Rad) wurde entsprechend der Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die folgenden 14 Zytokine wurden für die geplante Untersuchung ausgewählt: CCL2 (MCP-1), CXCL1 (KC), G-CSF, GM-CSF, IFN-gamma, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12(p40), IL-13, IL-17 und TNF-alpha. Die Durchführung erfolgte mittels Reagenzsystemen der Firma Bio-Rad. Entsprechend der Anzahl der untersuchten Proben inklusive der Standards

wurden die Anti-Zytokin-Antikörper konjugierte *bead*-Mixtur nach dem ersten Waschen der leeren Filterplatte mit 300 µl Waschpuffer (Bio-Rad) je *well* in die jeweiligen *wells* pipettiert und verblieb dort nach der Vakuumfiltration. Jeder der nachfolgend beschriebenen Waschschritte beinhaltete eine anschließende Vakuumfiltration. Im nächsten Arbeitsschritt wurde einmal gewaschen und 50 µl der vorverdünnten Standardreihe (mit einem Konzentrationsbereich von 0,195 bis 3,200 pg/ml), 50 µl der BAL-Flüssigkeitsproben oder 50 µl der 1:4 vorverdünnten Plasmaproben hinzugefügt, anschließend wurde die Filterplatte 30 min bei 300 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Filterplatte dreimal gewaschen, 25 µl des vorverdünnten Biotin konjugierten Multiplex-Detektions-Antikörpers hinzu pipettiert und für 30 min bei 300 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde die Filterplatte erneut dreimal gewaschen. Nachfolgend wurden 50 µl des vorverdünnten Streptavidin konjugierten Phykoerythrins in die jeweiligen *wells* pipettiert, 10 min bei 300 rpm auf dem Schüttler inkubiert und nochmals dreimal gewaschen. Nach der letzten Vakuumfiltration wurden je *well* 125 µl *assaybuffer* hinzugefügt und die Filterplatte wurde danach für 5 min bei 1100 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Schließlich wurde die Filterplatte am Luminex 100 eingelesen und die Zytokinkonzentrationen mittels der *Bio-Plex-Manager-Version 3.0-Software* ausgewertet. Die Zytokindaten der BAL-Lösungs- und der Plasmaproben wurden in pg/ml angegeben. Die im Ergebnisteil aufgeführten UfCP assoziierten Veränderungen werden als Prozent im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (= 100 %) dargestellt.

#### **3.2.3.3.6.2 *Lincoplex - Cardiovascular disease panel (CVD)***

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Plasmakonzentrationen von Markern zu untersuchen, die indikativ für kardiovaskuläre Erkrankungen sind. Wie es schon im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde, basierte auch dieses Panel auf der *Multiplex-Suspension-Array*-Technik, dem Luminex 100 und den Lincoplex Panels CVDI und CVDII (Millipore). Für die weitere Untersuchung des Plasmas wurden die folgenden sieben Proteine ausgewählt: Adiponektin, Fibrinogen, Matrix Metalloproteinase 9, sE-Selektin, sICAM-1, sVCAM-1 und total PAI-1. Das Protokoll erfolgte, in ähnlicher Weise wie bereits für Bioplex beschrieben, entsprechend der Angaben des Herstellers.

### 3.2.3.3.7 Histologie

#### 3.2.3.3.7.1 *Entwässerung und Paraffineinbettung von Gewebe*

Die einzubettenden Gewebe wurden sofort nach Eintritt des Todes in 4 % paraformaldehydhaltige PBS-Lösung fixiert und über Nacht bei 4 °C in der Lösung belassen, wobei die Lungen noch zusätzlich mit einem Druck von 20 cm H<sub>2</sub>O befüllt wurden, um weitgehend ein Kollabieren des Gewebes zu vermeiden. Die Herzen und die Lebern wurden mittels Eintauchen über Nacht in Fixierungspuffer eingebettet, wobei nur mit den Lebern eine vorangegangene Perfusionsfixation über die *vena abdominalis* durchgeführt wurde. Am nächsten Tag erfolgte die Entwässerung, bei der sich das im Gewebe befindliche Wasser zunächst durch Alkohol, dann durch Xylol und durch Paraffin mithilfe des Einbettautomatens (TP 1020, Leica) folgendermaßen ersetzt wurde:

30 min Waschen in Leitungswasser; 1 × 1 Std in 70 % Ethanol; 1 × 1 Std in 80 % Ethanol; 1 × 1 Std in 96 % Ethanol; 2 × 2 Std in 96 % Ethanol; 1 × 1 Std in 100 % Ethanol; 2 × 2 Std in 100 % Ethanol; 1 × 1 Std in Xylol; 1 × 2 Std in Xylol; 1 × 1 Std in Paraffin; 1 × 2 Std in Paraffin (Merck).

Anschließend wurde das Gewebe an der Paraffinausgießstation (Histocentre 2, Shandon) in Einbettförmchen mit frischem Paraffin eingebettet. Die Formen wurden zunächst auf RT und dann bei 4 °C weiter abgekühlt, danach wurden die eingebetteten Präparate aus den Formen gelöst.

#### 3.2.3.3.7.2 *Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitten*

Schnitte von paraffineingebettetem Gewebe wurden mit einem Rotationsmikrotom (2040 Autocut, Reichert-Jung) in 4 µm Dicke angefertigt. Zum Schneiden wurde der Block auf dem Teller des Mikrotoms eingespannt und entsprechend ausgerichtet. Der Winkel des Mikrotommessers wurde eingestellt und anschließend wurde der Block in schneller Folge so lange geschnitten, bis das Präparat erreicht war. Die Gewebeschnitte wurden zunächst bei RT in Leitungswasser gelegt und anschließend zur Streckung in ein 50 °C warmes Wasserbad gegeben. Im Anschluss wurden die Schnitte auf Superfrost-Objektträger (Menzel) aufgetragen und über Nacht bei 60 °C getrocknet. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung in Objektträgerkästen bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

#### 3.2.3.3.7.3 *Immunhistochemische Färbungen*

Die angefertigten Paraffinschnitte wurden nun für die weitere Anwendung deparaffinisiert.



Dies erfolgte zunächst in  $2 \times 5$  min Xylol, rehydriert wurde in einer absteigenden Alkoholreihe in  $2 \times 1$  min 100 % Alkohol,  $1 \times 1$  min 90% Alkohol,  $1 \times 1$  min 80% Alkohol,  $1 \times 1$  min 70 % Alkohol und  $1 \times 1$  min Aquadest. Die Inkubation der Schnitte für 20 min in 1,8 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Methanol-Lösung diente der Inhibition von endogenen Peroxidasen. Die Schnitte wurden nachfolgend in destilliertem Wasser gewaschen und in Citrat-Puffer pH 6,0 (DAKO, Glostrup, Dänemark) für 15 min bei 270 Watt im Mikrowellenofen erhitzt. Zunächst wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern bei Raumtemperatur mit Shandon-Coverplates in das Shandon-Sequenza®-Slide-Rack eingespannt und mit 1 x PBS gewaschen. Das Volumen zwischen Coverplate und Objektträger beträgt laut Herstellerangaben 100  $\mu\text{l}$ . Demnach wurde zur Sicherheit grundsätzlich ein Volumen von 120  $\mu\text{l}$  pipettiert. Im Anschluss erfolgte ein Block-Schritt mit 2 % rabbit-Serum (Verdünnung 1:50; S-5000, Vektor Laboratories), entsprechend dem verwendeten sekundären Antikörper, der aus der gleichen Spezies stammte, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren. Daraufhin wurde für 60 Minuten mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Die Konzentrationen der jeweiligen Primär-Antikörper wurden mittels einer Titration ermittelt. Die verwendeten Konzentrationen bzw. Verdünnungen, die für die folgenden Färbungen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 6 beschrieben.

Primärantikörper	Firma	Verdünnung
<i>rat anti-mouse Fibrinogen</i>	BD Bioscience, USA	1:50
<i>rabbit anti-mouse CXCL 1(KC)</i>	Cedarlane, Kanada	1:50

**Tabelle 6:** Verwendete Primärantikörper

Nach einem Waschschrift wurden die Gewebeschnitte mit dem Sekundärantikörper *rabbit anti-rat* biotinylierten Antikörper (BA-4001, Vektor Laboratories, Burlingame, CA, USA) mit einer Verdünnung von 1:200 für 30 min inkubiert, dann wurde gewaschen und nachfolgend für 30 Minuten mit dem Avidin-Biotin-Komplex inkubiert (ABC; Elite/Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Dabei wurde Reagenz A und Reagenz B mit einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt. Die Antikörperbindung wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Substrat und dem VECTOR® NovaRED™ (VECTOR® NovaRED™ Substrate Kit SK-4800, Vector Laboratories) als Chromogen für 10 min gefärbt. Für die Herstellung der NovaRed-Färbungslösung wurden in 5 ml aquadest 3 Tropfen von Reagenz 1 (Verdünnung 1:33), 2 Tropfen von Reagenz 2 (1:50), 2 Tropfen Reagenz 3 (1:50) und 2 Tropfen  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1:50) hinzugegeben. Im Anschluss wurde mit 1 x PBS gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte für 3 min

mit VECTOR® HEMATOXYLIN-Lösung (Vector Laboratories). Danach wurden die Gewebeschnitte kurz in aquadest gewaschen und in kurzen Abständen 10-mal in eine NH<sub>4</sub>OH-Lösung (37 mM) getaucht. Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte für 3 min in aquadest gewaschen und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert: 2 × 1 min in 96 % Ethanol, 2 × 1 min in 100 % Ethanol und 2 × 5 min in Xylol. Mit VectaMount™ Mounting Medium (H-5000; Vector Laboratories) und Deckgläsern wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern eingedeckelt und zur Untersuchung bzw. Auswertung mikroskopiert.

### **3.2.3.3.8 Hämatologische Analyse**

Für die hämatologische Untersuchung wurde das retroorbital entnommene Blut in EDTA-Röhrchen aufgenommen (Sarstedt) und innerhalb 1 Stunde unter Verwendung des ADVIA 120 Hämatologie Systems (Bayer Diagnostics) gemessen.

#### **3.2.3.3.8.1 *Prinzip des ADVIA 120***

Beim ADVIA 120 der Firma Bayer Diagnostics handelt es sich um ein auf dem optoelektrischem Messprinzip basierendem Durchflusszytometer. Die Ermittlung der verschiedenen Blutparameter des kleinen und großen Blutbildes erfolgt in vier analytisch getrennten Schritten und in drei Kanälen. Während die Hämoglobinbestimmung im Fotometer erfolgt, werden die Parameter, die mithilfe der Erythrozyten- und Thrombozytenmethode sowie der Basophilen-Methode ermittelt werden, im Laserkanal bestimmt. Für die Messungen nach der Peroxidase-Methode steht der Peroxidasekanal zur Verfügung.

#### **3.2.3.3.8.2 *ADVIA 120 - Software und Auswertung***

Durch die Kombination von Analyseeinheit und angegliederter Computereinheit mit der Software ADVIA 120 für Windows® NT ist die Handhabung durch eine vorherige Wahl der Spezies Maus und der danach vorgegebenen Softwaremaske sehr vereinfacht und erlaubt die Darstellung der Ergebnisse in tabellarischer Form.

### **3.2.3.3.9 FACS - Analyse von Leukozyten durch Aktivierungsmarker**

Die Detektion von Proteinen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Durch verschiedene Färbungen können Proteine auf der Oberfläche und im Inneren von Zellen mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert werden. Mithilfe eines Durchflusszytometers werden die Fluores-

zenz-Intensitäten gemessen. Dabei erhält man Aussagen über die Anzahl fluoreszierender Zellen und die Stärke der Fluoreszenz auf den einzelnen Zellen. So können Rückschlüsse gezogen werden, wie stark ein Protein in oder auf intakten Zellen exprimiert wird, ohne dass diese Populationen vorher in aufwendigen Anreicherungs-schritten isoliert werden müssen. Zur Phäotypisierung der Monozyten und der Granulozyten wurde eine Multicolor-Immunofluoreszenz-Färbung mit anschließender Messung in einem Durchflusszytometer der Firma BD (LSRII) durchgeführt. Die Daten wurden mit der Aufnahme-Software FACSDiVa generiert und mit dem Programm *FlowJo Version 7.2.2* (Tree Star Inc.) ausgewertet. Das Protokoll zur Zelloberflächenfärbung mit konjugierten primären Antikörpern ist im Folgenden wiedergegeben. Alle Schritte, wenn nicht anders beschrieben, wurden in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte und bei 4 °C durchgeführt:

Zunächst erfolgte eine Erythrozytenlyse mittels 600 µl NH<sub>4</sub>Cl-Tris-Lösung (Seite 149), die zu 200 µl Blut in Eppendorf-Gefäßen pipettiert und für 10 min bei RT auf dem Schüttler bei 30 rpm inkubiert wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension über ein Nylonnetz in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Das danach zentrifugierte und mit FACS-Puffer gewaschene Zellpellet wurde in FACS-Puffer resuspendiert, in 96-Loch-Mikrotiterplatten (Rundboden, Nunc) in jeweils 2 wells für Färbung 1 und Färbung 2 mit je 200 µl überführt und zentrifugiert (Tabelle 7).

Laser	PMT	Langpass-Filter	Bandpass-Filter	Fluorochrom	Färbung 1 Parameter	Färbung 2 Parameter
Blau: 488 nm	G	-	488/10	-	FSC/SSC	FSC/SSC
	F	505 LP	530/30	FITC	Ly-6G	Ly-6G
	E	550 LP	575/26	PE	CD49d	CD54
	D	600 LP	610/20	-	Propidium Iodid	Propidium Iodid
	B	685 LP	695/40	PerCP-Cy5.5	GR-1	GR-1
	A	755 LP	780/60	PE-Cy7	-	-
Violett: 405 nm	B	-	450/50	<i>Pacific Blue</i>	-	-
	A	505 LP	525/50	<i>Cascade Yellow</i> (Biotin-Streptavidin)	CD18	CD18
Rot: 633 nm	C	-	660/20	APC	CD11b	CD11b
	B	710 LP	730/45	Alexa Fluor 700	CD45	CD45
	A	755 LP	780/60	APC-Alexa 750	-	-

**Tabelle 7:** Parameter- und Instrumentenkonfiguration von Färbung 1 und Färbung 2

Die restliche Zellsuspension wurde für die *single color staining* (SCS) und ungefärbte Zellen für die spätere Kompensation auf 9 weitere wells mit je 150 µl aufgeteilt. Der Rest der Zellsuspension wurde verworfen. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde vor der Antikörperinkubation, zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen an Fc-

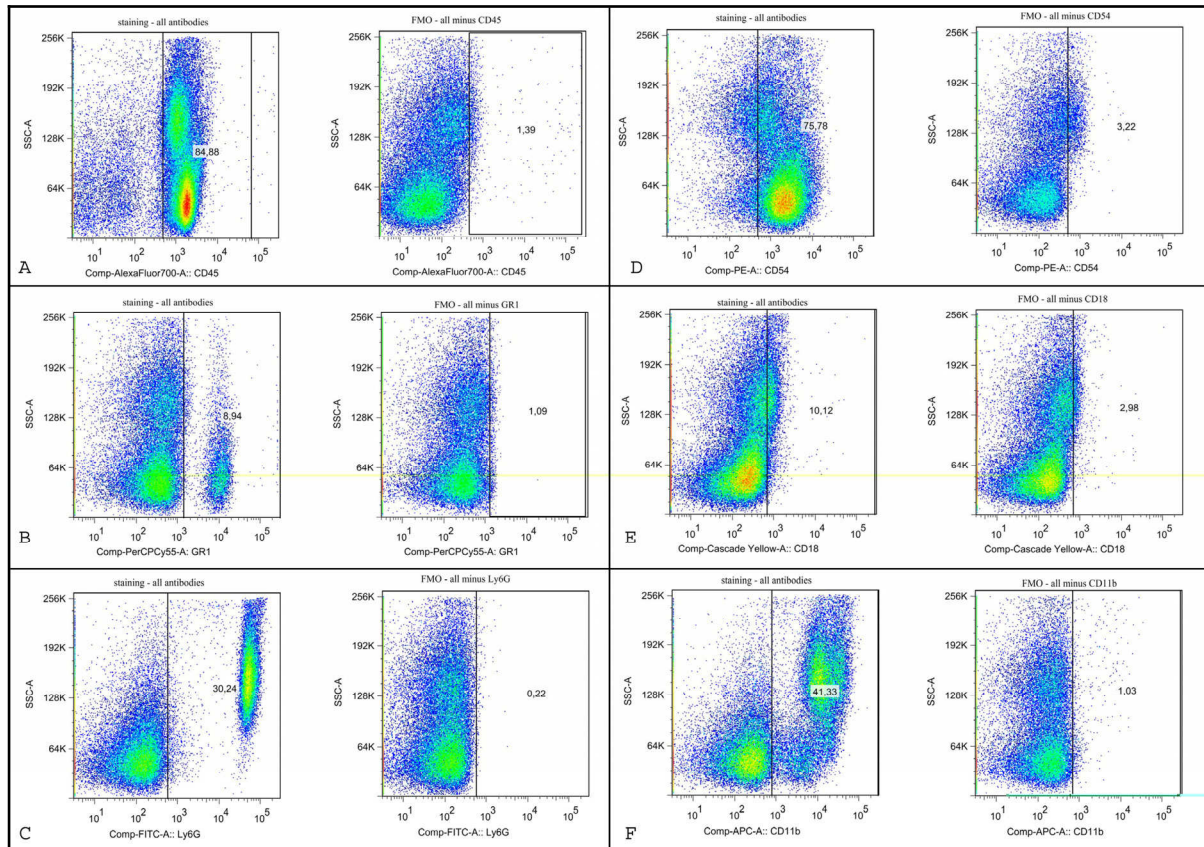
Rezeptoren, 50 µl Fc-Block (1:500; BD Pharmingen) in jedes *well* hinzupipettiert und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 150 µl FACS-Puffer gewaschen und eine 20-minütige Inkubation auf Eis erfolgte entweder mit 50 µl Antikörper-Mixtur (aus Färbung 1 oder Färbung 2, Tabelle 7) oder mit einzelnen Antikörpern für die SCS. Die Antikörper waren entweder direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen oder mit Biotin gekoppelt. Alle Antikörper wurden vor der Verwendung titriert, um optimale Färbeergebnisse zu erhalten und in der späteren Anwendung in den daraus ausgewählten Verdünnungen eingesetzt. Alle für die Färbung verwendeten Antikörper und deren eingesetzte Verdünnungen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Antikörper	Firma	Konzentration [mg/ml]	Verdünnung	Fluorochrom	Klon	Best.-Nr.
CD45	BioLegend	0,5	1:2000	ALEXA Fluor <sup>R</sup> 700	30-F11	103128
GR-1	BD Pharmingen	0,1	1:400	PerCP-Cy5.5	RB6-8C5	552093
Ly-6G	BD Pharmingen	0,5	1:200	FITC	1A8	551460
CD11b	BD Pharmingen	0,1	1:400	APC	M1/70	553312
CD18	eBioscience	0,5	1:100	Biotin	M18/2	13-0181
CD54	BD Pharmingen	0,2	1:200	PE	3E2	553253
CD49d	BD Pharmingen	0,1	1:200	PE	9C1	557420
PI	Sigma	2	1:100	PI		550013
Streptavidin (SA-CY)	eBioscience	1	1:1000	CascadeYellow		17-4317
FcγIII/II Rezeptor-Block (CD16/CD32)	BD Pharmingen	0,5	1:500	-	2.4G2	553142

**Tabelle 8:** Übersicht der FACS-Antikörper und andere Reagenzien

Danach wurde noch 50 µl PI (Verdünnung 1:100) hinzupipettiert und für 5 min inkubiert, um die toten Zellen anzufärben. Anschließend wurde 4-mal gewaschen und zur Färbung des biotinylierten Antikörpers wurde zu dem Zellpellet 50 µl nun der Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff hinzupipettiert (SA-Cy, 1:1000; eBioecience) und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 3-mal gewaschen und die Proben vor dem Einlesen am Durchflusszytometer in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Bei der Messung wurden die Proben automatisch aus einer 96-Mikrotiter-Platte am HTS des LSRII eingelesen, bis die Anzahl von 30.000 CD45<sub>pos</sub>-Zellen für jede Probe erreicht war. Nach der Messung erfolgte die komplette Auswertung mit FlowJo. Mittels *unstained* und *single colour stainings* war es möglich die Kompensation jedes verwendeten Kanals nachträglich in FlowJo durchzuführen. Anstelle von Isotypkontrollen wurden FMO(*Fluorescence minus one*)-Kontrollen verwendet, um positive und negative Regionen definieren zu können. Dabei werden alle Fluorochrome ohne das Fluorochrom von Interesse in dem entsprechenden Kanal gemessen. Damit erhält man nach der Kompensation das verbleibende „Grundrauschen“ in dem Kanal, welches durch die Signale

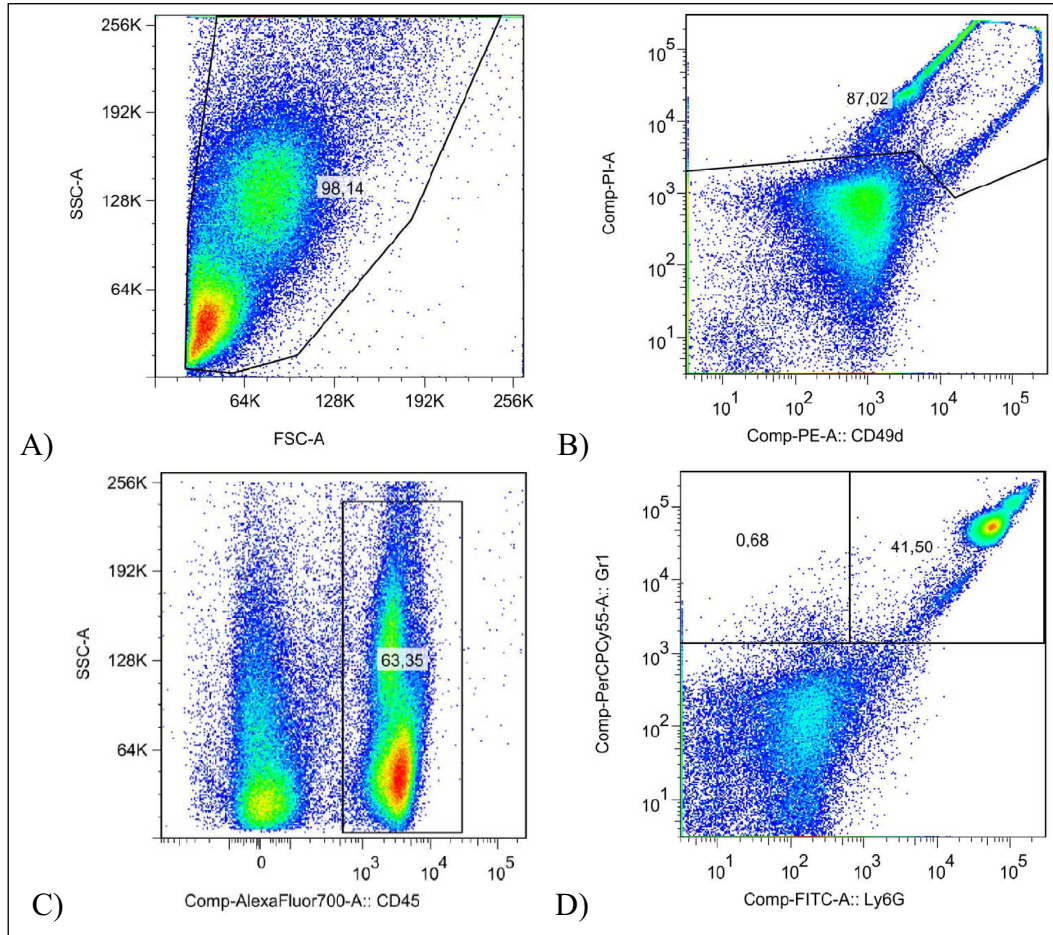
(Emissionen der Fluorochrome) aus allen anderen Kanälen verursacht wird. Um dieses Phänomen vorab zu minimieren oder auszuschließen, werden die Bandpass-Filter für die jeweiligen Kanäle so ausgewählt, dass ein Überlappen der Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome in den jeweiligen Kanälen möglichst gering ist (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Die Bilder A bis F stellen Färbungen mit allen Antikörpern (linkes Feld) und einem FMO-Mix (rechtes Feld) dar, wobei die Zellen entlang der y-Achse entsprechend ihrer Granularität und der x-Achse entsprechend dem Fluoreszenzsignal aufgetragen sind. Der „cut-off“ zwischen positiv und negativ gefärbten Zellen wird im rechten Feld so gesetzt, dass die rechteckige Region rechts von den negativ gefärbten Zellen maximal 5 % Zellen enthält. A) CD45; B) GR-1; C) Ly-6G; D) CD54 (auch repräsentativ für CD49d); E) CD18 und F) CD11b.

Dieses Ergebnis ermöglicht es nun einen korrekten „cut-off“ in der Auswertung setzen zu können, d.h. eindeutig zwischen negativ und positiv gefärbten Zellen zu unterscheiden. Diese Methode wird bei *Multi-color flow cytometry* bevorzugt verwendet (Baumgarth and Roederer et al. 2000). Im nächsten Schritt wurde eine Gatingstrategie erstellt (Abbildung 8), wobei zunächst ein klassisches Leukozytengate im FSC- und SSC-Kanal in der Dotplot-Darstellung generiert wurde (Abbildung 8A). Tote Zellen können beispielsweise unspezifisch Antikörper binden. Die Detektion toter Zellen erfolgte durch den in der DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid [PI] (Roche), wobei die Zellmembran lebender Zellen das Eindringen des Farbstoffes verhindert. Demnach wurden  $PI_{pos}$ , d.h. tote Zellen, auf diese Weise

aus der Analyse ausgeschlossen (Abbildung 8B). Die  $PI_{neg}$ -Population wurde anschließend auf  $CD45_{pos}$ -Zellen gated (Abbildung 8C). CD45 ist ein Zelloberflächen-Marker, der nur auf Leukozyten exprimiert ist.



**Abbildung 8: Gatingstrategie für die Datenanalyse der Durchflusszytometrie.** A) Intakte Zellen werden als Erstes durch das FSC/SSC-Profil identifiziert (Dotplot). B) Tote Zellen werden auf Basis des  $PI_{pos}$ -Signals eliminiert. C) Lebende Zellen werden nach  $CD45_{pos}$ -Leukozyten über deren SSC/CD45-Signal-Muster gated. D) Die Region im Feld rechts oben zeigt  $GR1_{pos}Ly6G_{pos}$ -Granulozyten und das Feld links oben  $GR1_{pos}Ly6G_{neg}$ -Monozyten mit lebenden Zellen werden nach  $CD45_{pos}$ -Leukozyten über deren SSC/CD45-Signal-Muster gated. FMO(*Fluorescence minus one*)-Kontrollen dienen zur Definition von „positiven“ und „negativen“ Regionen (Baumgarth and Roederer et al., 2000).

Die weitere Auswertung nach granulozytären und monozytären Zellen erfolgte durch die *sub-gates*:  $GR1_{pos}Ly6G_{pos}$ -Granulozyten und  $GR1_{pos}Ly6G_{neg}$ -Monozyten (Abbildung 8D). Für diese zwei Subpopulationen wurde die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (GeoMean FI), als Maß für die Expressionsstärke eines Antigens, herangezogen. In diesem Fall galt dies für die Aktivierungsmarker CD54 (ICAM-1), CD49d/Homodimer des VLA-4 Rezeptors und CD18/CD11b, die das Heterodimer MAC-1 repräsentieren (Frampton et al., 2006).

### 3.2.4 Statistik

Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Students T-Test ermittelt (MS Excel, T-Test Funktion & unabhängige T-Test, gleiche Probengrößen, heteroskedastisch) indem die zeitgleichen Kontrollen mit den UfCP exponierten Gruppen verglichen wurden. Die statistische Signifikanz wurde für \*:  $p < 0,05$  angenommen.

Die Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (*standard error of the mean, SEM*) dargestellt. UfCP-expositionsassoziierte Effekte wurden in % als relative Veränderung zu den zeitgleichen Kontrollen dargestellt.



## 4 Ergebnisse

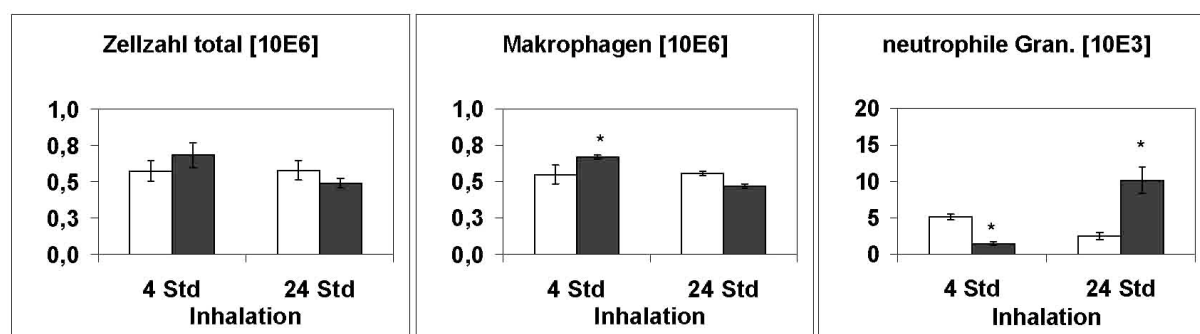
### 4.1 Inhalation von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln (UfCP)

#### 4.1.1 Pulmonale Reaktion

##### 4.1.1.1 Untersuchung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

###### *Veränderungen in den Zellzahlen nach der Inhalation von UfCP*

Im Vergleich zu reinluftexponierten Kontrolltieren zeigten die mit ultrafeinen Partikeln exponierten Mäuse (UfCP, Massenkonzentration =  $440 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , Anzahlkonzentration =  $6,4 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$ ) eine moderate, aber klar detektierbare pro-entzündliche Antwort. Die mikroskopische Untersuchung von Zytospin-Präparaten ergab nach 24 Stunden UfCP-Exposition einen 4-fachen Anstieg von neutrophilen Granulozyten in der broncheoalveolären Lavageflüssigkeit (BAL, Abbildung 9). Dieser neutrophilen Reaktion ging bereits ein geringer, aber signifikanter Anstieg der Makrophagenanzahl in der Lavage voraus, der in der BAL-Flüssigkeit bereits nach 4-stündiger UfCP-Exposition festgestellt wurde. Die Zahl normalisierte sich nach 24-stündiger Exposition wieder. In anderen Zellpopulationen wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert.



**Abbildung 9: Unterschiede der Zellzahlen in der broncheoalveolären Lavageflüssigkeit mittels mikroskopischer Untersuchung von Zytospin-Präparaten (Seite 46f, 3.2.3.1).** Weiße Balken repräsentieren die Kontrolltiere, schwarze Balken kennzeichnen die mit UfCP exponierten Gruppen. Dargestellt ist der Mittelwert der Einzeltiere  $\pm$  Standardfehler,  $n = 8$ , (\*:  $p < 0,05$ )

###### *Unterschiede des Protein- und Zytokingehaltes*

Der gesamte Proteingehalt aus der BAL-Flüssigkeit stieg von  $95,9 \pm 8,4 \mu\text{g}/\text{ml}$  (Kontrolltiere) auf  $136,3 \pm 6,2 \mu\text{g}/\text{ml}$  nach 4-stündiger UfCP-Exposition ( $p < 0,05$ ) an und fiel zum späteren Untersuchungszeitpunkt wieder auf den Basalwert der Kontrollmäuse ab ( $106,5 \pm 4,2 \mu\text{g}/\text{ml}$  vs.  $106,5 \pm 9,9 \mu\text{g}/\text{ml}$ , nicht signifikant).



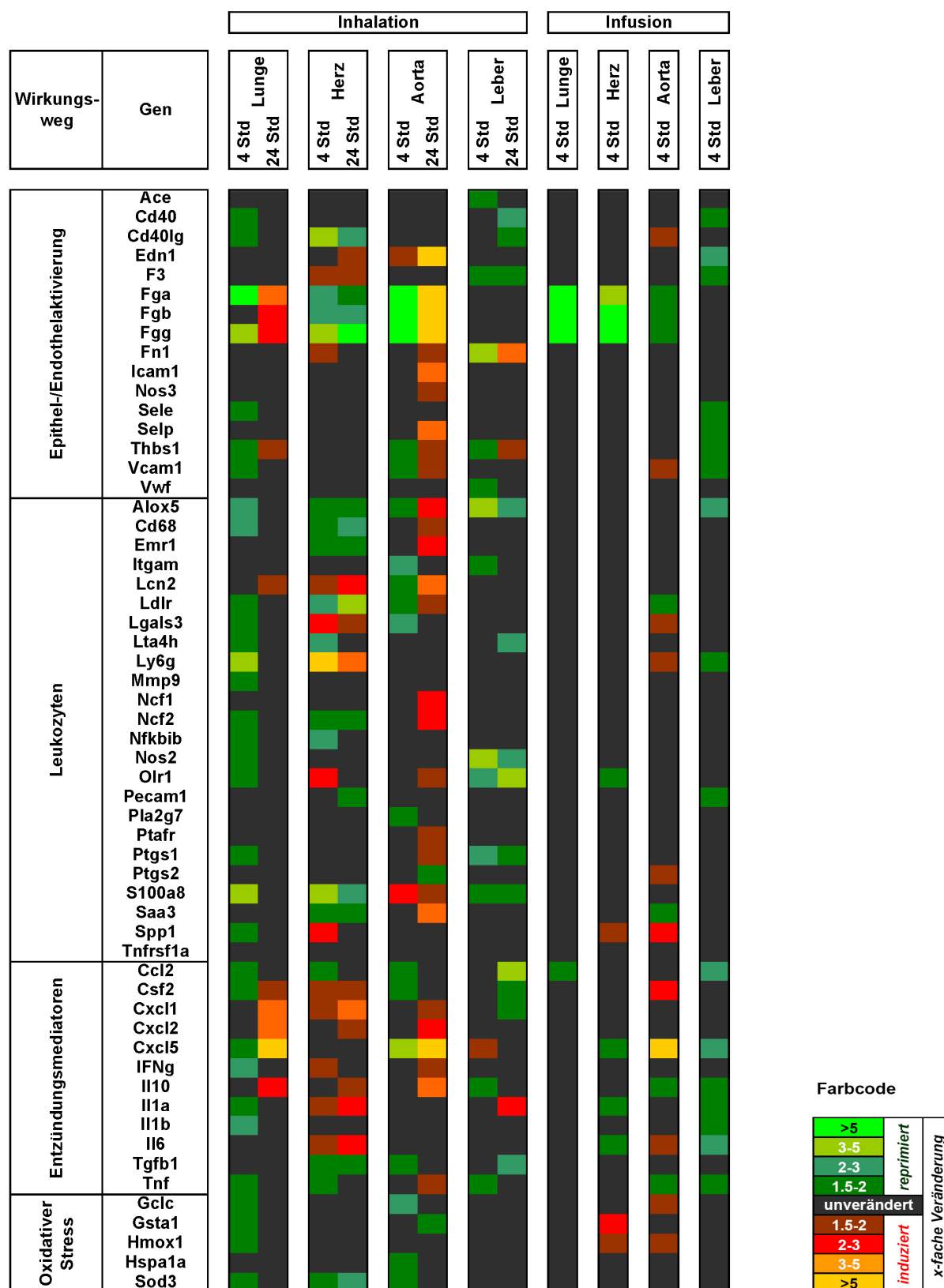
Von 14 Zytokinen, die mittels des Multiplex-Suspension-Protein-Array-Systems in der BAL-Flüssigkeit untersucht wurden, lag die Konzentration bei 5 Zytokinen (GM-CSF, IL-1 beta, IL-10, IL-17 und TNF-alpha) unterhalb des Detektionsbereiches (Tabelle 9). Keine Veränderungen in der BAL-Flüssigkeit wurden für die Zytokine G-CSF, IL-2, IL-6 und IL-13 festgestellt. Jedoch nahmen zunächst Konzentrationen des IL-8 homologen, neutrophilen Chemokins CXCL1 (KC Chemokin) nach 4-stündiger UfCP-Exposition ab, während nach 24-stündiger UfCP-Exposition dann die 4-fache Menge zu messen war ( $p < 0,05$ ). Die IFN-gamma-Konzentration stieg nach der kurzen Expositionszeit erst um das 2-Fache an, nahm dann aber um das 2-Fache nach der 24-stündiger UfCP-Exposition wieder ab. Jedoch zeigten diese Veränderungen keine statistische Signifikanz. Die Konzentrationen von IL-1 alpha und IL-12(p40) waren bei beiden Untersuchungszeiträumen nach der Exposition von UfCP signifikant herabgesetzt.

Analyte	Konz	Inhalation					
		4 Std			24 Std		
		Kontrolle	UfCP	p	Kontrolle	UfCP	p
total Protein	µg/ml	95,9 ± 8,4	136,3 ± 6,2	*↑	106,5 ± 4,2	106,5 ± 9,9	
CXCL1	pg/ml	5,8 ± 1,3	2,2 ± 0,3	*↓	2,4 ± 0,2	10,9 ± 1,5	*↑
G-CSF	pg/ml	0,2 ± 0,05	0,1 ± 0,05		0,1 ± 0,04	0,2 ± 0,05	
GM-CSF	pg/ml	<OOR	<OOR		<OOR	<OOR	
IFN-gamma	pg/ml	1,3 ± 0,4	2,0 ± 1,0		2,2 ± 0,6	1,1 ± 0,5	
IL-1 alpha	pg/ml	2,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1	*↓	2,2 ± 0,2	1,5 ± 0,1	*↓
IL-1 beta	pg/ml	<OOR	<OOR		<OOR	<OOR	
IL-2	pg/ml	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,2		1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2	
IL-6	pg/ml	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,3		0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2	
IL-10	pg/ml	<OOR	<OOR		<OOR	<OOR	
IL-12(p40)	pg/ml	23,9 ± 1,3	17,0 ± 1,1	*↓	18,7 ± 1,5	14,2 ± 1,2	
IL-13	pg/ml	5,4 ± 1,8	4,2 ± 2,0		7,2 ± 1,9	7,6 ± 2,4	
IL-17	pg/ml	<OOR	<OOR		<OOR	<OOR	
TNF-alpha	pg/ml	<OOR	<OOR		<OOR	<OOR	

**Tabelle 9: Gesamtprotein- [µg/ml] und Zytokinkonzentrationen [pg/ml] in der BAL-Flüssigkeit, < OOR = kleiner als der Messbereich, Mittelwerte ± Standardfehler, n = 8, (\*:  $p < 0,05$ )**

#### 4.1.1.2 Genexpressionsanalyse

Zunächst wurde eine quantitative RT-PCR-basierte Genexpressionsstudie für die Organe Lunge, Herz, Aorta und Leber durchgeführt, um die organspezifischen Antworten identifizieren zu können, die nach 4- und 24-stündiger UfCP-Inhalation induziert wurden. Es wurden dafür Marker-Gene ausgewählt, die in entzündlichen und Gerinnungs- bzw. koagulativen Wirkungswegen involviert sind. Diese Marker wurden in die Wirkungswege Epithel-/Endothelaktivierung mit koagulativen Effekten, Leukozyten (Akkumulation), Entzündungsmediatoren und oxidativen Stress gruppiert, um letztlich ein Reaktionsmuster erkennen zu können.



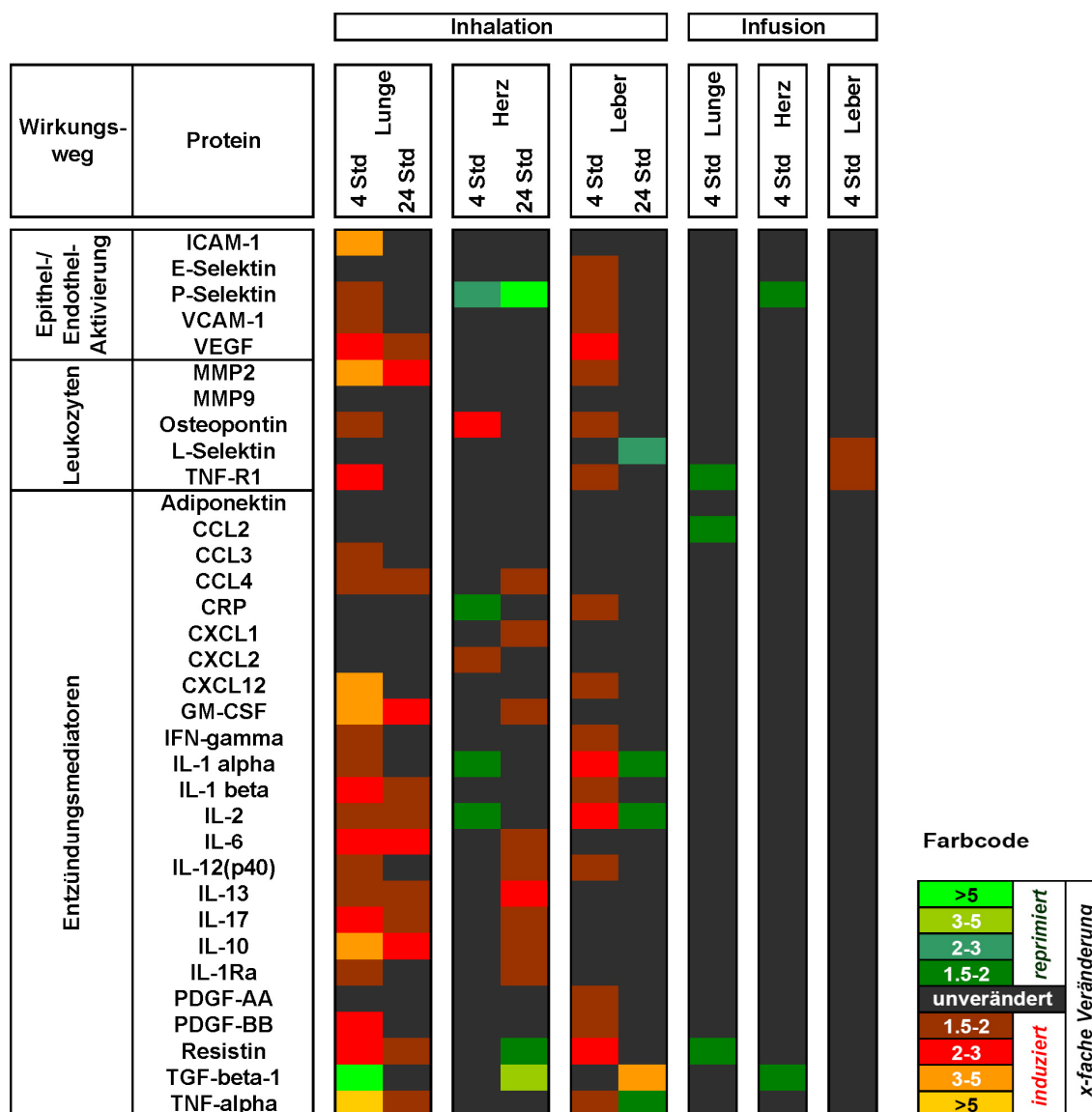
**Abbildung 10: Genexpressionsanalyse von Lunge, Herz, Aorta und Leber nach 4- und 24-stündiger UfCP-Inhalation und 4 Stunden nach UfCP-Infusion.** Die Expressionswerte sind als vielfache Veränderung relativ zu den Kontrollen dargestellt. Um die Übersichtlichkeit und die biologische Signifikanz besser hervorzuheben, wurden Veränderungen um mehr als den Faktor 1,5 (d.h. < 1,5 oder > 1,5) farblich hervorgehoben. Dabei steht Rot für Induktion und Grün für Repression (siehe Farbcode). Die Gene wurden zu den hier dargestellten Wirkungswege gruppiert: Epithel-/Endothelaktivierung, Leukozyten (Akkumulation), Entzündungsmediatoren (Zytokine, Freisetzung) und oxidativem Stress

Zellspezifische Marker für die Invasion und Akkumulation von Leukozyten in dem Gewebe wie zum Beispiel Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten wurden der Gruppe Leukozyten zugeordnet. Eine tabellarische Liste der untersuchten Gene ist in Tabelle A1 auf Seite 141 zu finden. Die durch eine UfCP-Exposition induzierten Veränderungen bei den Versuchstieren wurden als Vielfaches versus reinluftexponierten Kontrolltieren als *heatmap* dargestellt (Abbildung 10). Eine Veränderung in der Transkriptkonzentration die mindestens größer oder kleiner als das 1,5-Fache der Kontrollwerte betrug, wurde hierbei bereits als biologisch signifikant ausgewertet. Dies ist zwar ein relativ kleiner Faktor, da ansonsten üblicherweise erst ein Faktor von 2 für eine biologisch relevante Veränderung akzeptiert wird. Jedoch wurde hier der Faktor 1,5 gewählt, da sich eine Anzahl von funktionell gruppierten Genen hinsichtlich ihres Reaktionsmusters bereits in dieser Größenordnung ähnlich verhielt. Dieses Prinzip wurde in gleicher Weise auch für die Proteinexpressionsanalyse verwendet, siehe dazu folgendes Kapitel 4.1.1.3. Das Reaktionsmuster in der Lunge zeigte nach 4-stündiger UfCP-Exposition keine der untersuchten Gene induziert. Vielmehr ergab sich eine Repression der meisten Markergene für Entzündungsmediatoren (*Il1a*, *IFN $\gamma$* ), entzündliche Zellrekrutierung (*Ly6g*, *Alox5*), oxidativem Stress (*Gclc*, *Gsta1*), alveoläre epitheliale Aktivierung (*Fga*, *Fg $\beta$* , *Fg $\gamma$* ) und endotheliale Aktivierung (*Cd40*, *Thbs1*). Nach 24-stündiger UfCP-Exposition veränderte sich die pulmonale Antwort und mehrere pro-entzündliche Gene zeigten sich nun induziert: vor allem Gene, die für Entzündungsmediatoren (Zytokine) codieren, welche für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich sind, wie zum Beispiel *Cxcl1*, *Cxcl2* und *Cxcl5*. Darüber hinaus gab es auch weitere induzierte Gene, die repräsentativ für endotheliale Aktivierung (*Thbs1*, *Edn1*) und epitheliale Aktivierung (*Fga*, *Fg $\beta$* , *Fg $\gamma$* , Abbildung 10) stehen. Während die meisten Markergene nach der ersten Expositionsphase (4-stündige Inhalation) herunter geregelt waren, gab es zur späteren Phase (24-stündige Inhalation) 10 Gene, die sich bis zu 11-fach induziert zeigten. Diesem Ergebnis entsprechen die schon erwähnten Daten aus der Lavage, die eine moderate Entzündungsreaktion nach 24-stündiger UfCP-Exposition aufzeigten (4.1.1.1).

#### 4.1.1.3 Proteinexpressionsanalyse

Für die Proteinexpressionsanalyse wurden Proteinextrakte von gruppenweise gepoolten Lungenhomogenaten verwendet. Dabei wurde die Gesamtproteinkonzentration jeder Probe gemessen und auf eine einheitliche Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und bei Bedarf verdünnt. Im Anschluss wurden von 34 verschiedenen löslichen Proteinen die Konzentrationen gemessen und dabei die Konzentrationen der UfCP exponierten Tiere mit den Werten der

Kontrollen verglichen. Eine Veränderung in der Proteinkonzentration wurde nach dem gleichen Prinzip dargestellt, wie es schon für die Genexpressionsanalyse angewendet wurde. Um den Vergleich der Reaktionsmuster der einzelnen Organe zu vereinfachen, wurde zur Darstellung eine *heatmap* gewählt, vergleichbar zur Darstellungsweise der Genexpressionsdaten (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Proteinexpressionsanalyse von Lunge, Herz und Leber nach 4- und 24-Stunden-Inhalation von UfCP und 4 Stunden nach UfCP-Infusionsexposition dar.** Die Expressionswerte sind als vielfache Veränderung relativ zu den Kontrollen dargestellt. Um die Übersichtlichkeit und die biologische Signifikanz besser hervorzuheben, wurden Veränderungen um mehr als den Faktor 1,5 (d.h.  $< 1,5$  oder  $> 1,5$ ) farblich hervorgehoben. Dabei steht Rot für Induktion und Grün für Repression (siehe Farbcode). Die Proteine wurden hier zu folgenden *pathways* gruppiert: Epithel-/Endothelaktivierung, Akkumulation von Leukozyten und Produktion von Entzündungsmediatoren (Zytokine)

Die Konzentrationen der Gewebeproteine wurden relativ zu den jeweiligen Kontrollen dargestellt. Eine Übersichtstabelle der absoluten Konzentrationen ist im Anhang zu finden. Die

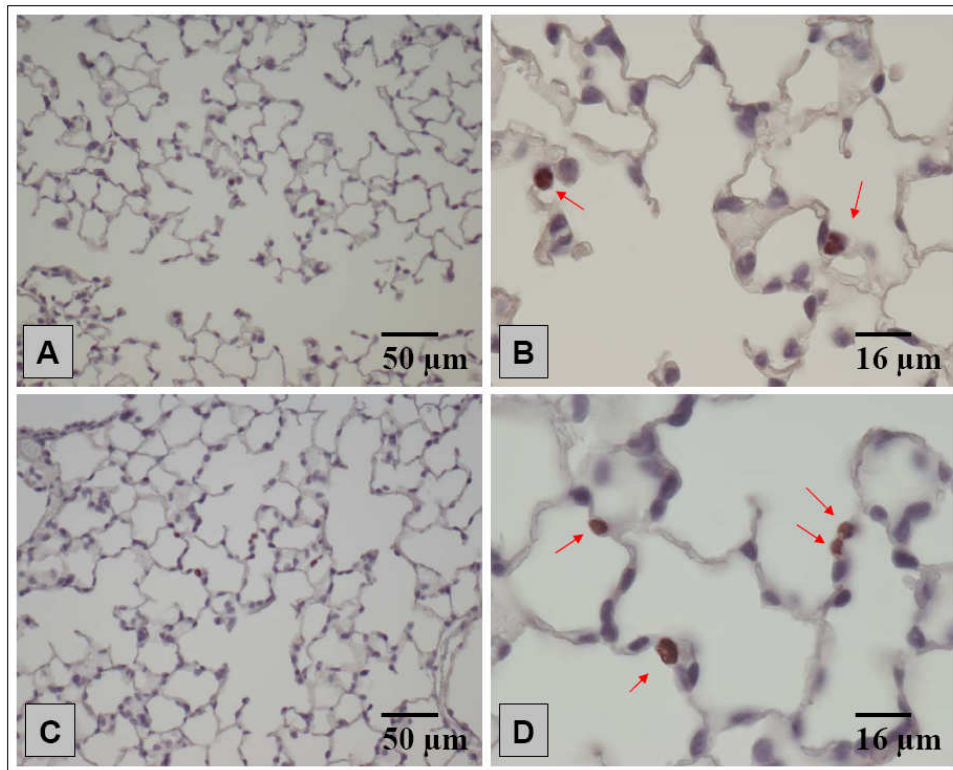
Proteinanalyse ließ schon nach 4-stündiger UfCP-Exposition eine Entzündungsreaktion erkennen. Konzentrationen von Markern, die einer Endothelaktivierung zugeordnet werden, wie zum Beispiel VCAM-1, ICAM-1, P-Selektin und VEGF zeigten sich erhöht. Darüber hinaus war eine Zunahme von pro-entzündlichen Zytokinen und Akute-Phase-Proteinen wie TNF-alpha, IL-10, CXCL12, GM-CSF, IL-1 beta und IL-6 und ein 3-facher Anstieg der pro-entzündlichen Matrix Metalloproteinase (MMP2) zu detektieren. Diese lässt auf eine Akkumulation von aktivierten neutrophilen Zellen im Lungengewebe schließen. Die erhaltenen Werte für CXCL1 waren zu beiden Untersuchungszeitpunkten nach der UfCP-Exposition um das 1,4-Fache angestiegen. Diese tendenzielle Veränderung ist allerdings in Abbildung 11 nicht zu erkennen, da hier der Schwellenwert für eine farbliche Kennzeichnung bei einer 1,5-fachen Veränderung lag. TGF- $\beta$ 1, ein anti-entzündliches Zytokin, war um mehr als das 10-Fache herabgesetzt, allerdings nur in der frühen Expositionsphase. Hier ist noch anzumerken, dass eine stärkere pro-entzündliche Antwort nach der 4-stündigen im Vergleich zur 24-stündigen UfCP-Exposition festzustellen war. Zum späteren Expositionszeitpunkt war von den Endothel-Aktivierungsmarkern lediglich von VEGF und von den entzündlichen Zellmarkern nur von MMP2 ein moderater Anstieg festzustellen. Jedoch waren mehrere entzündliche Zytokine nach 24-stündiger Inhalation von UfCP erhöht gemessen worden. Im Besonderen galt dies für GM-CSF, IL-6 und IL-10.

#### **4.1.1.4 Freisetzung von CXCL1 durch alveolare Epithelzellen**

Die Studie von Andre und Mitarbeiter (2006) zeigte, dass das CXCL1 (KC Chemokin) in der Lunge sowohl auf Genexpressionsebene wie auch auf Proteinebene nach 24-stündiger UfCP-Exposition induziert war. Dieses Chemokin wird mit der entzündlichen Wirkung von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln hinsichtlich der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe in Zusammenhang gebracht. Aus diesem Grund war zu Beginn der vorliegenden Arbeit das Interesse auf CXCL1 gerichtet.

In der vorliegenden Studie konnte die spezifische zelluläre Lokalisation des neutrophilen CXCL1 Chemokins anhand von immunhistochemischen Färbungen von Lungenschnitten identifiziert werden. Es zeigte sich, dass alveolare Typ-II-Epithelzellen des Septums die Hauptquelle von CXCL1 nach 24-stündiger Inhalation von UfCP sind (Abbildung 12). Im Gegensatz dazu zeigten die Lungen von reinluftexponierten Mäusen oder nach 4-stündiger UfCP-Exposition nur sporadisch CXCL1 positive Epithelzellen. Dieses Ergebnis bestätigte die nach 24-stündiger UfCP-Exposition gemessene Zunahme des CXCL1 Zytokins in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit, die erhöhte RNA-Transkriptkonzentration und die ten-

denziell erhöhte Proteinkonzentration im Lungengewebe sowie die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten.



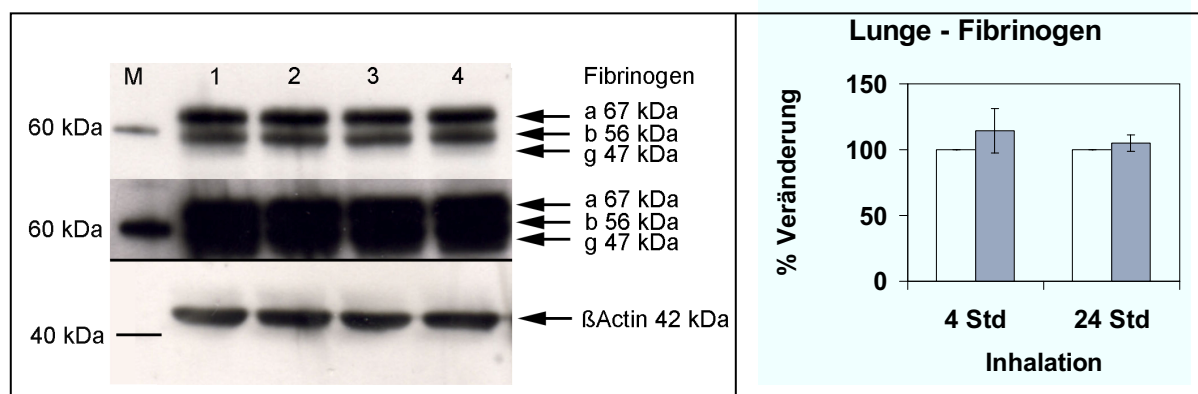
**Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von CXCL1-Protein von Lungenschnitten nach 24-stündiger UfCP-Exposition. Alveoläre Epithelzellen sind die Hauptquelle dieses Chemokins. Bilder A und B repräsentieren beispielhaft Lungenschnitte von Kontrollmäusen, Bilder C und D zeigen Schnitte von mit UfCP exponierten Mäusen. Rote Pfeile zeigen CXCL-1 positiv gefärbte alveolare Typ-II-Epithelzellen**

#### 4.1.1.5 Fibrin(ogen)deposition detektierbar an Endothelzellen von kapillaren Blutgefäßen

Fibrinogen ist ein lösliches Plasma-Glykoprotein, das hauptsächlich und konstitutiv in der Leber synthetisiert wird. Aber auch von Epithelzellen ist bekannt, dass diese nach Aktivierung durch IL-6 Fibrinogen basolateral freisetzen können (Haidaris et al., 1997; Laurens et al., 2007). Da nach 24-stündiger UfCP-Inhalation eine 3-fache Induktion von alpha-, beta- und gamma-Fibrinogen mRNA-Expression (*Fga*, *Fgβ*, *Fgy*) beobachtet werden konnte, war es nun von Interesse diese Veränderung auch auf Proteinebene quantitativ nachzuweisen.

Dazu diente zunächst die Westernblot-Analyse, in der ein Fibrin(ogen) spezifischer Antikörper verwendet wurde, d.h ein Antikörper, der spezifisch Fibrinogen sowie Fibrin-Polypeptid-Untereinheiten detektiert (Khandoga et al., 2004). Mittels einer Analyse von Plasma-Fibrinogen- und Fibrin-Proben konnte gezeigt werden, dass der Antikörper zwischen alpha-,

beta- und gamma-Peptiden von Fibrinogen und Fibrinprotein zu unterscheiden vermag. Die drei Peptid-Banden von Fibrin zeigten sich um etwa 2 kDa kleiner als die Peptid-Banden von Fibrinogen (Daten sind nicht gezeigt), was sich durch die Abspaltung der Peptiduntereinheiten von ca. 18 Aminosäuren erklären lässt. Damit und mit der Größenabschätzung der spezifischen Banden (Abbildung 13) wurde für unsere Analysen festgestellt, dass die drei detektierten Banden die jeweiligen Polypeptide von Fibrinogen und nicht von Fibrin sind. Im Gegensatz dazu ist bei der immunhistochemischen Untersuchung eine derartige Unterscheidung nicht möglich, siehe auch die entsprechende Studie von Khandoga und Mitarbeiter (2004).

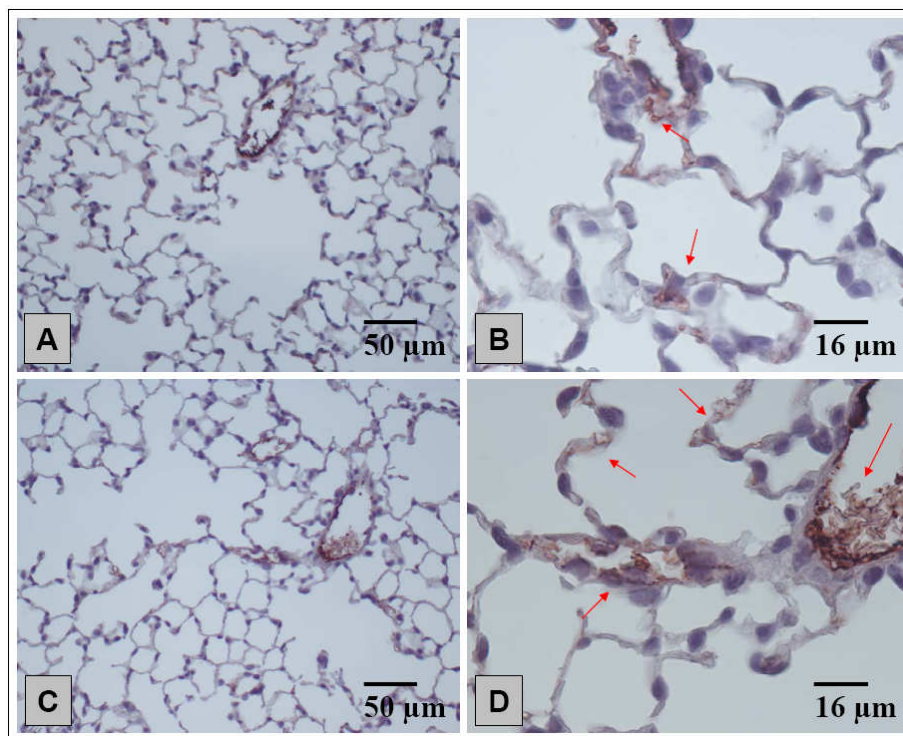


**Abbildung 13: Fibrinogenexpression in Proteinlysaten von Lungengewebe nach 4- und 24-stündiger Inhalation von entweder Reinluft oder UfCP.** Das linke Feld zeigt die detektierte Menge an alpha-, beta- und gamma-Fibrinogen-Polypeptiden mit unterschiedlichen Entwicklungszeiten von 1 (oben) und 5 Minuten (unten), repräsentiert durch schwarze Banden. M = Marker, 1 = 4-Std-Inhalation Reinluft-Kontrolle, 2 = 4-Std-Inhalation mit UfCP, 3 = 24-Std-Inhalation Reinluft-Kontrolle und 4 = 24-Std-Inhalation mit UfCP. Die eingescannten Blots (n = 3) wurden mit der *Syngene software image* Analyse auf Signifikanz getestet. Die quantifizierten Intensitäten der Alpha-Peptid-Banden wurden auf beta-Aktin (Ladekontrolle) normalisiert und in %-Veränderung relativ zu den Kontrollen dargestellt (siehe dazu rechtes Feld). Weiße Balken repräsentieren Kontrollen und schwarze die mit UfCP exponierten Gruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n = 3

Die Quantifizierung bei der Westernblot-Analyse erfolgte mithilfe der densitometrischen Auswertung der Fibrinogen-Alpha-Peptid-Banden von 3 wiederholten Blots (n = 3). Die Untersuchung ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied nach der Exposition von UfCP im Vergleich zu den Kontrollen. Es war lediglich ein leichter Anstieg der Fibrinogenkonzentration nach 4 Stunden zu erkennen (Abbildung 13), der ebenso in dem Ergebnis der nachfolgenden immunhistologischen Untersuchung zu sehen war.

Um die zelluläre Lokalisation und Deposition von Fibrin(ogen) aufzeigen zu können, wurden Lungenschnitte mittels immunhistochemischen Färbungen mit dem Fibrin(ogen) spezifischen Antikörper untersucht (Khandoga et al., 2004). Dabei zeigte sich Fibrin(ogen)deposition auf Endothelzellen von kapillaren Blutgefäßen (Abbildung 14). Dies war besonders bei Tieren der 4-Stunden-UfCP-Expositionsgruppe nachzuweisen.





**Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von Fibrin(ogen)-Protein in Lungenschnitten.** Die Abbildungen bzw. die roten Pfeile zeigen die Deposition von Fibrin(ogen) auf dem Endothel von kleinen und kapillaren Blutgefäßen des Septums. Bilder A und B zeigen exemplarisch Lungenschnitte von Kontrollmäusen, Bilder C und D die Befunde nach 4-stündiger UfCP-Exposition

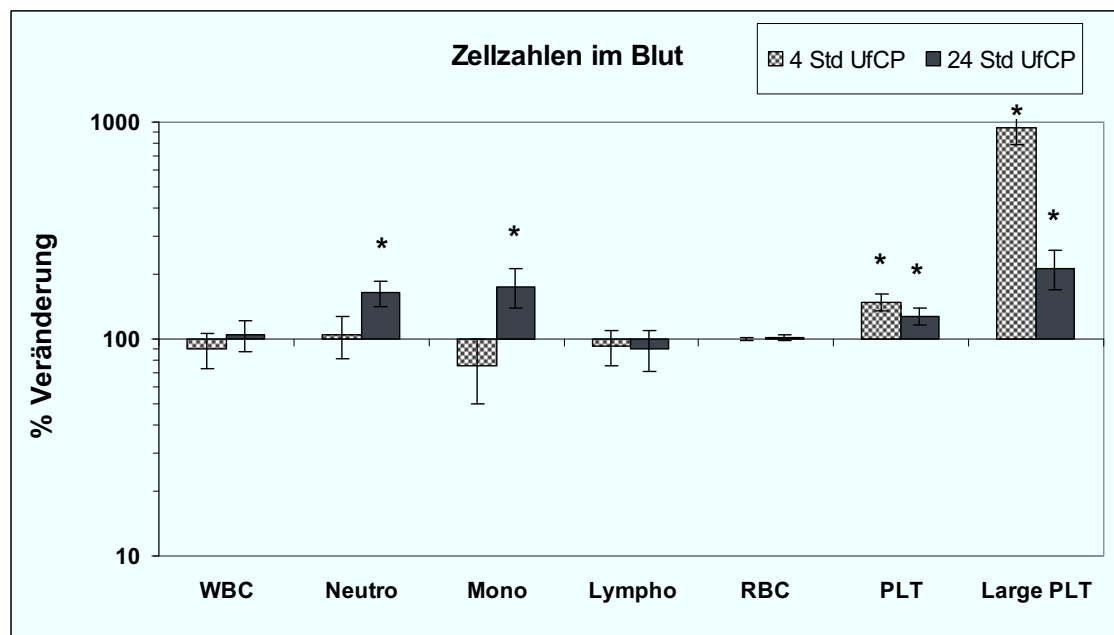
## 4.1.2 Reaktion im Blut nach Inhalation von UfCP

### 4.1.2.1 Hämatologische Analyse

Um die Auswirkungen der Inhalation mit UfCP auf der systemischen Ebene zu bestimmen wurden Blutproben der untersuchten Tiere zunächst zur hämatologischen Untersuchung herangezogen (Abbildung 15). Während hier die relativen Veränderungen zwischen Kontroll- und exponierten Versuchstieren dargestellt werden, sind die absoluten Werte tabellarisch im Anhang zu finden.

Keine signifikanten Unterschiede wurden in der Zellzahl der weißen Blutkörperchen (WBC) gemessen, wobei die Zahl von neutrophilen Granulozyten (Neutro) nach 24-stündiger UfCP-Exposition signifikant auf 163 % zunahm. Ein vergleichbarer Effekt war für Blutmonozyten (Mono) zu sehen. Jedoch wurden keine Veränderungen in der Zahl der Lymphozyten (Lympho) im Blut gemessen. Die Zellzahlen der Erythrozyten (RBC) waren durch die UfCP-Exposition nicht beeinflusst, wohingegen sich nach 4 Stunden ein zellulärer Anstieg von Thrombozyten (PLT) um 49 % ( $p < 0,05$ ) nachweisen ließ, der nach 24 Stunden zwar noch erhöht (27 %), aber weniger stark ausgeprägt war.





**Abbildung 15: Hämatologische Analyse von Blutproben nach dem 4- und 24-stündigen Inhalationsexperiment (n = 8).** UfCP-assoziierte Veränderungen von Zellzahlen sind in Prozent relativ zu den zeitlich zugehörigen Reinluft-Kontrollen dargestellt. WBC = *white blood cells*, Neutro = *neutrophil granulocytes*, Mono = *monocytes*, Lympho = *lymphocytes*, RBC = *red blood cells*, PLT = *platelets*, Large PLT = *large platelets*. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n = 8; (\* =  $p < 0,05$ )

Die Untersuchung der Thrombozytenwerte ergab nach 4 Stunden einen beachtlichen 9-fachen Anstieg von Riesenthrombozyten (Large PLT,  $p < 0,05$ ), der bei 24-stündiger Inhalation nur zu einer 2-fachen Zunahme einstellte. Als Riesenthrombozyten werden sehr große unreife, retikulierte Thrombozyten bezeichnet. Diese Thrombozyten entstehen häufig bei einem gesteigerten Thrombozytenbedarf und werden durch Abschnürung aus den Megakaryozyten gebildet. Retikulierte Thrombozyten sind größer als reife Thrombozyten und beinhalten mehr RNA. Ein erhöhter Wert von retikulierten Thrombozyten ist ein Anzeichen dafür, dass das Knochenmark sehr aktiv ist und vermehrt neue Thrombozyten gebildet werden. Das Knochenmark reagiert damit, indem es größere Thrombozyten von den Megakaryozyten abschnürt (Martin et al., 1983). Entsprechend der gemessenen Zunahme an Thrombozyten und Riesenthrombozyten waren nach der Partikelexposition ebenso weitere Thrombozytenparameter verändert, die Informationen über die Gestalt der Thrombozyten und deren Aktivierungszustand liefern (Tabelle 10). Der zelluläre Anstieg an Riesenthrombozyten spiegelte sich in der signifikanten Zunahme des MPV (*mean platelet volume*) und der MPM (*mean platelet mass*) zu beiden Untersuchungszeitpunkten wieder ( $p < 0,05$ ). Der PDW (*platelet distribution width*) war allerdings nur nach 4-stündiger Inhalation von UfCP angestiegen ( $p < 0,05$ ). Auch der PCT (*platelet crit*) der sich aus der Thrombozytenzellzahl (PLT) und dem MPV berech-

net, stieg ebenso nur nach 4-stündiger Partikelexposition an ( $p < 0,05$ ). Darüber hinaus wurden die Veränderungen in der Thrombozytengestalt durch Veränderungen in der strukturellen Zusammensetzung der Thrombozyten begleitet. Der MPC (*mean platelet component*) ist ein Maß für die Granularität (alpha- und delta-Granula) der Thrombozyten und damit für deren Aktivierungszustand. Eine Aktivierung bzw. Degranulation der Thrombozyten geht mit einer Abnahme des MPC einher. Bezüglich der Verlässlichkeit des Parameters konnte gezeigt werden, dass eine Abnahme des MPC invers mit der Zunahme der P-Selektin Oberflächenexpression (CD62-P) auf Thrombozyten korrelierbar ist (Ahnadi et al., 2003). Der MPC nahm nach 4-stündiger UfCP-Exposition stärker als nach 24-stündiger Exposition ab ( $p < 0,05$ ). Der PCDW (*platelet component distribution width*) zeigte nach der Partikelinhalation einen signifikanten Anstieg zu beiden Untersuchungszeitpunkten. Die Thrombozytenwerte im peripheren Blut deuten auf eine Mobilisierung von Thrombozyten mit einem erhöhten Aktivierungszustand hin.

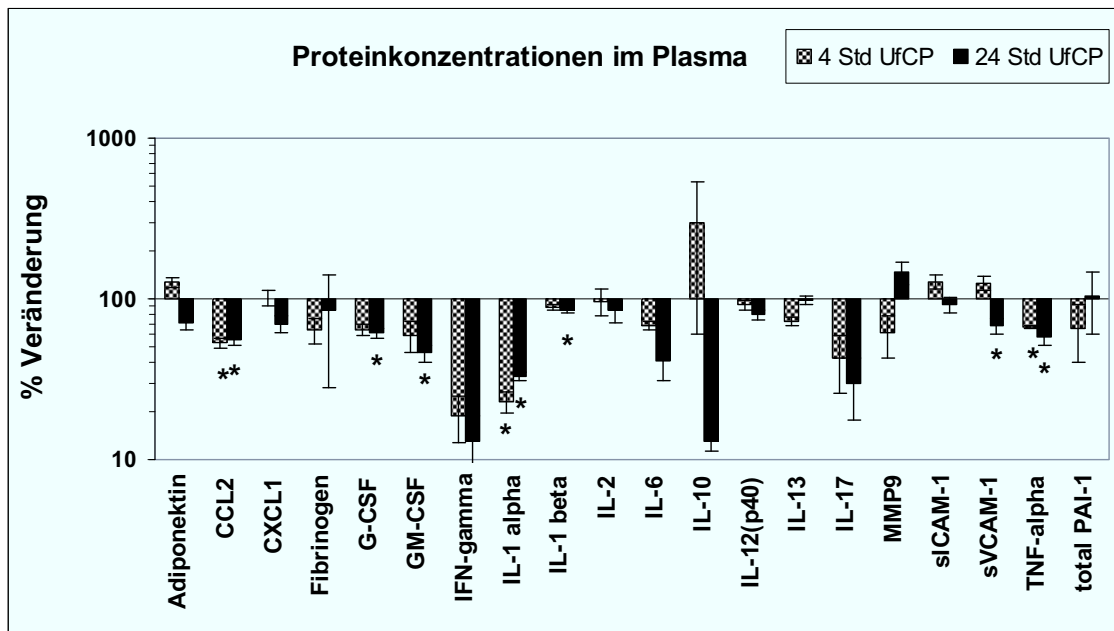
Thrombozyten Parameter	Inhalation					
	4 Std			24 Std		
	Kontrolle	UfCP	p	Kontrolle	UfCP	p
PLT ( $\times 10^9$ cells/ $\mu$ L)	809,50 $\pm$ 86,95	1203,13 $\pm$ 54,84	* $\uparrow$	868,50 $\pm$ 96,65	1103,57 $\pm$ 17,77	* $\uparrow$
Large PLT ( $\times 10^9$ cells/ $\mu$ L)	1,88 $\pm$ 0,40	17,63 $\pm$ 2,71	* $\uparrow$	4,25 $\pm$ 1,32	9,00 $\pm$ 1,34	* $\uparrow$
MPV (fl)	5,45 $\pm$ 0,15	7,66 $\pm$ 0,16	* $\uparrow$	5,99 $\pm$ 0,29	7,04 $\pm$ 0,10	* $\uparrow$
PCT (%)	0,45 $\pm$ 0,06	0,92 $\pm$ 0,04	* $\uparrow$	0,53 $\pm$ 0,08	0,78 $\pm$ 0,02	* $\uparrow$
PDW (%)	51,65 $\pm$ 1,15	58,70 $\pm$ 0,79	* $\uparrow$	53,53 $\pm$ 2,37	56,99 $\pm$ 1,02	* $\uparrow$
MPC (g/dl)	24,93 $\pm$ 0,42	19,86 $\pm$ 0,32	* $\downarrow$	23,53 $\pm$ 0,72	21,29 $\pm$ 0,21	* $\downarrow$
PCDW (g/dl)	7,41 $\pm$ 0,17	8,10 $\pm$ 0,08	* $\uparrow$	7,61 $\pm$ 0,24	8,21 $\pm$ 0,06	* $\uparrow$
MPM (pg)	1,23 $\pm$ 0,00	1,26 $\pm$ 0,00	* $\uparrow$	1,24 $\pm$ 0,01	1,27 $\pm$ 0,01	* $\uparrow$
PMDW (pg)	0,43 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,00		0,43 $\pm$ 0,00	0,43 $\pm$ 0,00	

**Tabelle 10: Hämatologische Thrombozyten Parameter im Blut.** Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 8$ , (\*:  $p < 0,05$ ). PLT = Thrombozyten, Large PLT = Große Thrombozyten, MPV = *mean platelet volume*, PCT = *platelet crit*, PDW = *platelet distribution width*, MPC = *mean platelet component*, PCDW = *platelet component distribution width*, MPM = *mean platelet mass*, PMDW = *platelet mass distribution width*

#### 4.1.2.2 Analyse von Entzündungsmediatoren im Plasma

Zur Detektion der Mediatoren, die potenziell durch die pulmonale Entzündungsreaktion aus der Lunge in den Blutkreislauf freigesetzt werden und möglicherweise verantwortlich sind für die Entstehung der extrapulmonalen Effekte im Blut, im Herzen, in der Aorta und in der Leber, wurden 21 lösliche Zytokine untersucht (Abbildung 16). Für den Großteil der gemessenen pro-entzündlichen Zytokine wurde eine signifikante Konzentrationsabnahme von 6 Zytokinen (CCL2, GM-CSF, G-CSF, IL-1 alpha, IL-1 beta und TNF-alpha) nach 24-stündiger UfCP-Exposition und nach 4 Stunden Partikelexposition von 3 Zytokinen (CCL2, IL-1 alpha und TNF-alpha) in gleicher Weise, aber weniger stark ausgeprägt beobachtet. Jedoch blieben

die Mittelwerte der Plasmakonzentrationen von CXCL1, IL-2, IL-12(p40) und IL-13 abweichend von den gemessenen Zytokinkonzentrationen in den Lungen unverändert. Unter den Markern, die als Indikatoren für Koagulation und Endothelaktivierung gemessen wurden, war sVCAM-1, die lösliche geschnittene Form des endothelialen Adhäsionsmoleküls VCAM-1, der einzige Marker, dessen Konzentration im Vergleich zu den Kontrollwerten über 1,7-fach herabgesetzt war ( $p < 0,05$ ). Im Gegensatz dazu schien dessen Konzentration während der frühen Expositionsphase, vergleichbar mit ICAM-1 Konzentrationen (sICAM-1), leicht erhöht zu sein (ns). Für das lösliche sE-Selektin lagen die Konzentrationen unterhalb des Detektionsbereiches. E-Selektin ist ein membranständiges, endotheliales Adhäsionsmolekül für Leukozyten und stellt gleichermaßen einen endothelialen Aktivierungsmarker dar, da es nur nach einer Aktivierung auf der Zelloberfläche exprimiert wird.

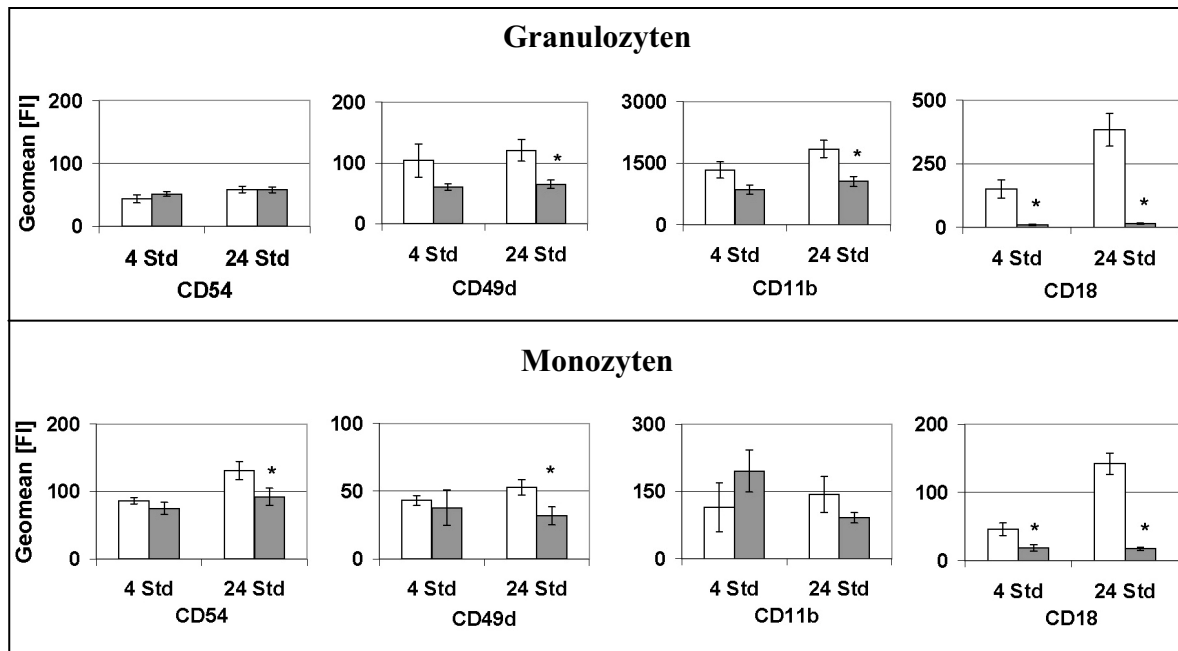


**Abbildung 16: Proteinanalyse von Plasmaproben nach Inhalation von UfCP.** Dargestellt sind UfCP-assoziierte Veränderungen der Zytokinkonzentrationen in Prozent relativ zu den zeitlich zugehörigen Kontrollen. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 8$ ; (\* =  $p < 0,05$ )

#### 4.1.2.3 Analyse von Leukozytenaktivierung mittels FACS

In der durchflusszytometrischen FACS-Analyse war das Interesse auf die Granulozyten und auf die Monozyten gerichtet, da zuvor gezeigt werden konnte, dass diese Leukozytensubpopulationen in die entzündliche Reaktion in der Lunge involviert waren. Ziel war es, den Aktivierungszustand von Leukozyten im Blut zu untersuchen, so wie es in der Studie von Framp-ton und Mitarbeiter (2006) beschrieben wurde. Demnach wurden die Integrine CD11b und CD18 des heterodimeren MAC-1 Rezeptors (CD11b/CD18) gewählt, der für die leukozytäre

Adhäsion an ICAM-1 der Endothelzellen von Bedeutung ist. Darüber hinaus wurde das Integrin CD49d, ein Homodimer des VLA-4 Rezeptors (CD29/CD49d), selektiert. Als weiterer Aktivierungsmarker der Leukozyten diente CD54 (ICAM-1), der jedoch nicht, falls er auf Leukozyten exprimiert ist, für die endotheliale Adhäsion von Bedeutung ist, da der passende Rezeptor auf dem Endothel fehlt. Vielmehr ist er an interleukozytären oder thrombozytären Adhäsionen beteiligt.



**Abbildung 17: Durchflusszytometrische-Analyse (FACS) von Blutproben nach der Inhalation von entweder der Reinluft oder UfCP.** Dargestellt ist das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität (Geomean FI) von den Adhäsionsmolekülen CD54, CD49d, CD11b und CD18, auf Granulozyten ( $GR1_{pos}Ly6G_{pos}$ ) und auf Monozyten ( $GR1_{pos}Ly6G_{neg}$ ). UfCP-assoziierte Änderungen in der Expression von Zelloberflächenmolekülen (schwarze Balken) werden im Vergleich zu Reinluft exponierten Kontrollen gezeigt (weiße Balken). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 8$ , (\*:  $p < 0,05$ )

Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass Granulozyten ( $GR1_{pos}Ly6G_{pos}$ -Zellen) keine expositionsabhängigen Veränderungen von CD54 (ICAM-1) in der Zelloberflächenexpression aufzeigten (Abbildung 17). Die Expressionen von CD11b (MAC-1) und CD49d (VLA-4) auf Granulozyten waren durch die Inhalation mit UfCP reprimiert, wobei die Abnahme nur für den späteren Untersuchungszeitpunkt signifikant war ( $p < 0,05$ ). Nach 4- und 24-stündiger Partikelinhalationen war eine substanzielle Reduktion von CD18 auf Granulozyten, aber auch auf Monozyten ( $GR1_{pos}Ly6G_{neg}$ -Zellen) zu beobachten. Abgesehen von CD18 zeigten die Monozyten nach 24-stündiger Inhalation von UfCP ein abnehmendes Signal an CD54 und CD49d Zelloberflächen-Aktivierungsmarkern.

### 4.1.3 Reaktion im Herz nach Inhalation von UfCP

#### 4.1.3.1 Genexpressionsanalyse

Ebenso wie es schon für die Lungen erfolgte, wurde auch von den Herzgeweben eine Genexpressionsanalyse durchgeführt und tabellarisch als Vielfaches im Vergleich zu den Reinluft exponierten Kontrollen dargestellt. Eine Übersicht der Ergebnisse dazu ist in Abbildung 10 auf Seite 68 gezeigt. Verschiedene Marker, die repräsentativ für frühe pro-entzündliche Reaktionen sind, zeigten sich nach der UfCP-Exposition induziert. Die Expression des *lymphocyte antigen 6 complex, locus G (Ly6g)*, welche vorwiegend in neutrophilen Granulozyten zu finden ist, dient hier als Nachweis für deren Akkumulation im untersuchten Gewebe. *Ly6g* war schon nach 4-stündiger UfCP-Exposition mehr als 5-fach erhöht. Dieses Ergebnis stimmt mit den erhöhten Transkriptkonzentrationen von Lipocalin-2 (*Lcn2*) und Matrix Metalloproteinase 9 (*Mmp9*) überein. Beide Marker sind dafür bekannt, hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten exprimiert zu werden (Andre et al., 2006).

Darüber hinaus war eine Vielzahl von Genen induziert, die für Proteine codieren, welche von Leukozyten sowie von aktivierten Endothelzellen freigesetzt werden. Darunter befanden sich immunmodulierende Gene wie *galectin-3 (Lgals3)* und *osteopontin (Spp1)* sowie das profibrotische Gen *fibronectin (Fn1)* und der prothrombotische *tissue factor (F3)*. Alle diese Gene zeigten sich nach der frühen Expositionsphase über 2-fach hochreguliert. Die Zytokinebene betrachtend waren Transkripte, die für neutrophil rekrutierende Zytokine codieren, wie zum Beispiel *Cxcl1* und *Cxcl2*, über 2-fach induziert. In vergleichbarem Ausmaß waren Induktionen für die Akute-Phase-Zytokine *Il1a* und *IFN $\gamma$*  sowie für den Granulozyten-Makrophagen-Stammzellfaktor (*Csf2*) zu verzeichnen. Jedoch gab es andere Gene, die pro-thrombotische (*Fibrinogen alpha, beta und gamma*) und entzündliche Reaktionen (lipoxxygenase (*Alox5*), *serum amyloid A3*, *Tnf*, und *nuclear factor kappaB inhibitor beta*) betreffend über 2-fach reprimiert waren. Abgesehen von der 2-fach reprimierten Expression von *Sod3* zeigten alle weiteren oxidativen Stressmarker keine Veränderung.

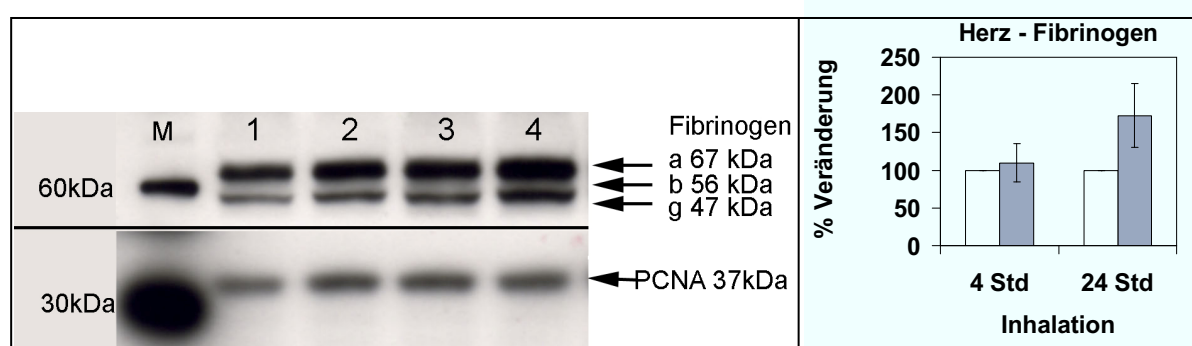
#### 4.1.3.2 Proteinexpressionsanalyse

Die Untersuchung des Herzgewebes auf Proteinebene zeigte, dass die kardiale Reaktion vor allem nach 24-stündiger UfCP-Exposition nachweisbar war (Seite 70, Abbildung 11). Zytokine wie zum Beispiel die Interleukine IL-6, IL-10, IL-12(p40), IL-13 und IL-17 waren durch die Partikelinhalation 2-fach induziert. Ebenso stark waren auch Zytokine wie CCL4, CXCL1 und GM-CSF angestiegen, allerdings nur nach 24-stündiger UfCP-Exposition. Nur das Prote-

in Osteopontin war schon nach 4-stündiger Partikelexposition mehr als 1,5-fach induziert. Nur wenige Proteine zeigten eine Abnahme ihrer Konzentrationen, wie zum Beispiel P-Selektin nach beiden Untersuchungszeitpunkten, C-reaktives Protein (CRP), IL-1 alpha und IL-2 nur nach 4-stündiger und Resistin und TGF-beta-1 nach nur 24-stündiger Partikelinhalation.

#### 4.1.3.3 Fibrin(ogen)deposition im Herz

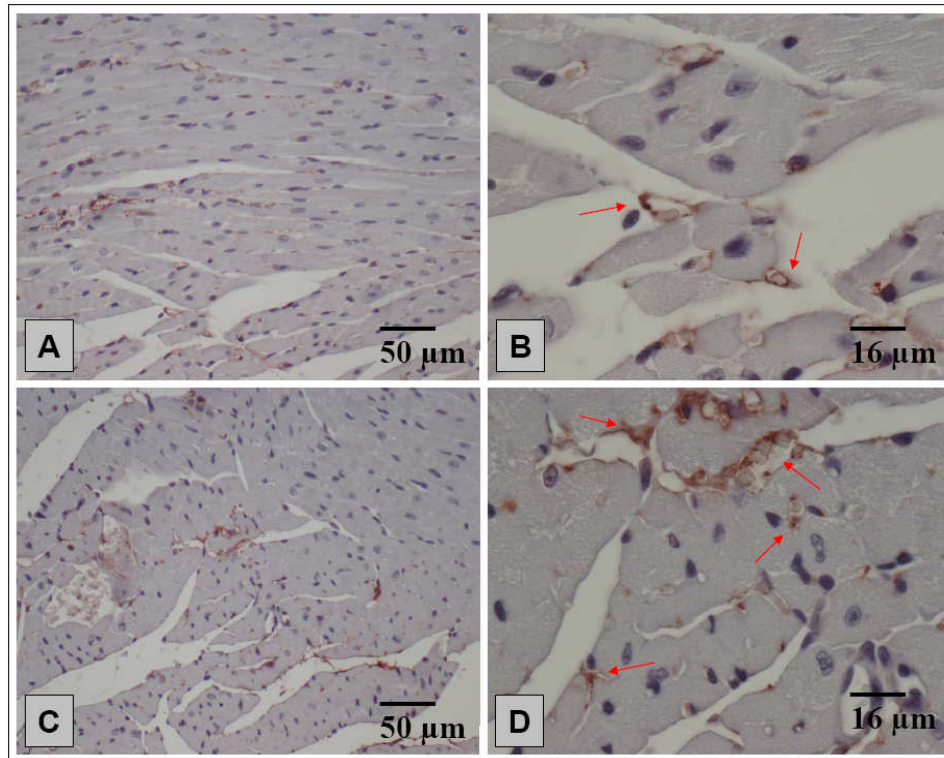
Die Untersuchung mittels der Westernblot-Analyse ergab tendenziell erhöhte, jedoch nicht signifikante Fibrinogendepositionen in den Herzen der Tiere nach 24-stündiger Exposition.



**Abbildung 18: Fibrinogenexpression in Proteinlysaten von Herzgeweben nach 4- und 24-stündiger Inhalation von entweder Reinluft oder UfCP.** Das linke Feld zeigt die detektierte Menge an Fibrinogenpolypeptiden alpha, beta und gamma, repräsentiert durch schwarze Banden. M = Marker, Bande 1 = 4-Std-Inhalation Reinluft-Kontrolle, 2 = 4-Std-Inhalation mit UfCP, 3 = 24-Std-Inhalation Reinluft-Kontrolle und 4 = 24-Std-Inhalation mit UfCP. Die eingescannten Blots (n = 3) wurden mit der *Syngene software image* Analyse auf Signifikanz getestet. Die quantifizierte Intensitäten der Alpha-Peptid-Banden wurden auf PCNA (Ladekontrolle) normalisiert und in %-Veränderung relativ zu den Kontrollen dargestellt, siehe rechtes Feld. Die weißen Balken repräsentieren Kontrollen und die schwarzen Balken die mit UfCP exponierten Gruppen. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler sind dargestellt, n = 3

Der tendenzielle Anstieg des Fibrinogengehaltes nach 24-stündiger UfCP-Inhalation (Abbildung 18) war in vergleichbarer Weise mit der immunhistologischen Analyse von Herzgewebeschnitten nachweisbar. Obwohl zum Teil Fibrin(ogen)depositionen in kleinen Gefäßen des Myokardiums detektiert werden konnten und auf den Schnitten einzelner Tiere leicht erhöhte UfCP assoziierte Fibrin(ogen)depositionen zu erkennen waren, reichte der beobachtete Unterschied allerdings nicht aus, um einen klaren signifikanten Unterschied zu deklarieren. Ein Grund war die erhöhte Variabilität von Fibrin(ogen)depositionen innerhalb der Kontrollgruppen (Abbildung 19).





**Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von Fibrin(ogen)protein in Herzschnitten.** Diese Abbildungen bzw. die roten Pfeile zeigen die Deposition von Fibrin(ogen) auf dem Endothel von kleinen Blutgefäßen des Myokardiums. Bilder A-B zeigen exemplarisch Herzschnitte von Kontrollmäusen und Bilder C-D die Befunde nach 4-stündiger UfCP-Exposition

#### 4.1.4 Reaktion in der Aorta nach Inhalation von UfCP

##### *Genexpressionsanalyse spezifischer Markergene*

Die limitierte Verfügbarkeit des Aortengewebes machte es unmöglich eine umfassende Proteinuntersuchung durchzuführen. Demnach lag besonders hier der Schwerpunkt auf der mRNA-Expressionsanalyse. Allgemein ergab die Genexpressionsanalyse von Gewebehomogenaten der Aorta entweder eine unveränderte Regulation oder eine Abnahme von Entzündungsmediatoren nach 4-stündiger UfCP-Inhalation, wohingegen der größte Teil der ausgewählten pro-entzündlichen Markergene besonders nach 24 Stunden induziert war (Seite 68, Abbildung 10). Eine starke pro-entzündliche und pro-koagulative endotheliale Reaktion konnte aus der erheblichen Hochregulation von Fibrinogen- und Endothelin-Transkripten sowie von *Icam1*, *Vcam1* und *Selp* nach 24-stündiger UfCP-Inhalation gefolgert werden. In der frühen Expositionsphase zeigten sich die Fibrinogen-Transkripte (*Fga*, *Fgβ* und *Fgγ*) zunächst 25- bis 50-fach reprimiert, wohingegen sie nach 24-stündiger UfCP-Exposition 6- bis 40-fach induziert waren. Ebenso waren Marker wie zum Beispiel *Emr1*, *Alox5*, *Ncf2* und *Ptgs1*, die induktiv für die Akkumulation von Monozyten und Granulozyten sind, nach 24-stündiger UfCP-Exposition über 2-fach induziert, jedoch zeigten sie sich in der frühen Phase größten-

teils unverändert oder gar reprimiert. Vergleichbar waren auch Transkripte pro-entzündlicher Zytokine wie *Cxcl1*, *Cxcl2* und *Cxcl5* nach 24 Stunden zwischen 2- und 12-fach induziert, diese blieben aber hauptsächlich in der frühen Phase unverändert oder zeigten sich sogar herunterreguliert. Das Chemokin LIX (*Cxcl5*), ein Chemokin, welches entscheidend für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ist, wies dieselbe Tendenz wie die Fibrinogen-Transkripte auf: Zunächst konnte nach 4 Stunden eine 4-fache Repression gemessen werden, die nach 24-stündiger Inhalation von UfCP in eine 12-fache Induktion überging. Gene repräsentativ für oxidativen Stress (*Sod3*, *Hspa1a*, und *Gclc*) waren in der frühen Phase deutlich herunterreguliert und erreichten innerhalb der zweiten Expositionsphase den Kontrollwert. In ähnlicher Weise war die Expression von *glutathione S-transferase alpha 1* (*Gsta1*), ein sensibler Marker für oxidativen Stress, um das 2-Fache nach 24 Stunden Exposition reprimiert.

## 4.1.5 Reaktion in der Leber nach Inhalation von UfCP

### 4.1.5.1 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse von Leberhomogenaten ergab weder nach 4-stündiger noch nach 24-stündiger UfCP-Inhalation einen Hinweis auf eine Entzündungsreaktion (Seite 68, Abbildung 10). Unter den Markern, die repräsentativ für Endothelaktivierung ausgewählt wurden, war offensichtlich nur Fibronektin (*Fn1*) durch die Partikelexposition betroffen und zwar zunächst 5-fach reprimiert und nach 24 Stunden 3- bis 4-fach induziert. Einige andere Gene, die relevant für den prothrombotischen *pathway* (*Vwf*, *Thbs1*, *F3*), für pro-entzündliche Proteine (*Alox5*, *Ptgs2*, *Nos2*) sowie für Zytokine wie *Ccl2* und *Cxcl1* sind, erwiesen sich auf Transkriptebene als 2-fach unterdrückt. Dies war vor allem nach der frühen Expositionsphase zu beobachten, wohingegen andere Marker (*Cd40*, *Cd40lg*, *Lgals3*, *Olr1*, *IFNg*, *Il10*) mehr zum späteren Untersuchungszeitpunkt herunterreguliert waren. Bemerkenswert war die Beobachtung, dass nur *Il1a* 2,5-fach induziert war, während für die anderen Akute-Phase-Marker, die *Il1b*, *Il-6*, *Tnf*, *Lcn2* und *Saa3* mit einbeziehen, keine expositionsbedingten Veränderungen zu detektieren waren.

### 4.1.5.2 Proteinexpressionsanalyse

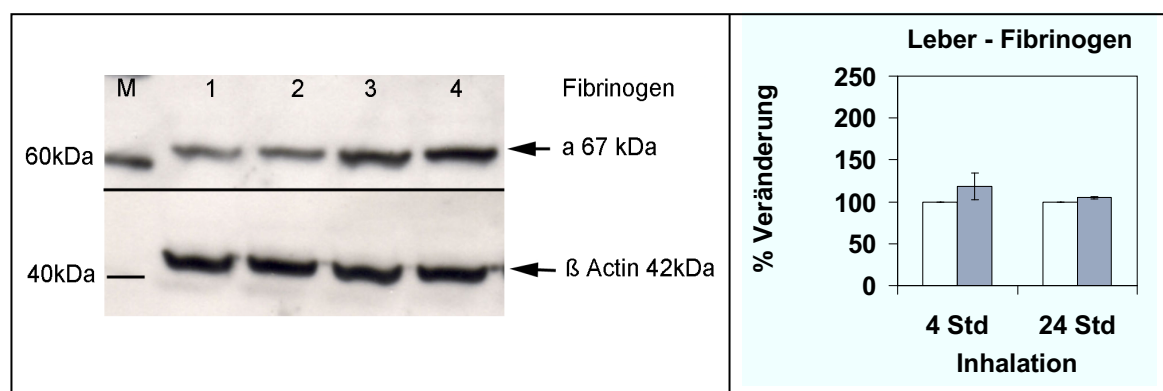
Die Proteinexpressionsanalyse von Leber-Homogenaten deckte nach 4 Stunden UfCP-Exposition eine allgemeine Konzentrationszunahme von pro-entzündlichen Markern auf (Seite 70, Abbildung 11), wohingegen nach 24 Stunden entweder keine Veränderung oder eine Konzentrationsabnahme gemessen werden konnte, mit der einzigen Ausnahme der 4-fach er-



höhten TGF $\beta$ 1-Konzentration. Proteinkonzentrationen von TNF-alpha, IL-1 alpha und das CRP, bekannt als Akute-Phase-Protein, waren nach der ersten Expositionsperiode fast 2-fach erhöht und erwiesen sich nach 24 Stunden Exposition entweder 2-fach reduziert (TNF-alpha) oder nicht beeinflusst (CRP). Unerwarteterweise blieben die Konzentrationen von IL-6 größtenteils unverändert, welches für die Induktion der Akute-Phase-Reaktion in der Leber bekannt ist. Die IL-2- sowie die Resistinkonzentration war nach 4-stündiger UfCP-Inhalation um das 2-Fache erhöht, wohingegen nach 24 Stunden deren Konzentrationen im Bereich der Kontrollwerte lagen. Marker, die mit einer Endothelaktivierung assoziiert werden, wie in besonderem Maße VCAM-1, VEGF und E-Selektin, zeigten einen über 2-fachen Konzentrationsanstieg nach 4-stündiger UfCP-Inhalation, der aber nach 24 Stunden unterhalb der Kontrollwerte zu messen war.

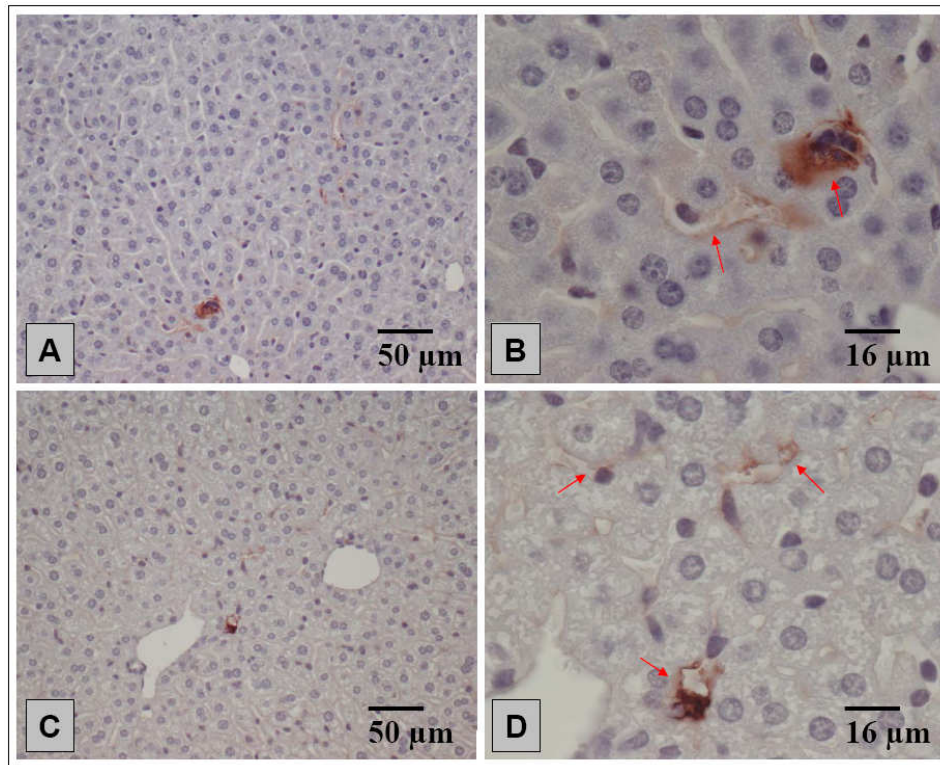
#### 4.1.5.3 Fibrin(ogen)deposition in der Leber

Die vermutete verstärkte Fibrin(ogen)deposition in der Leber nach der Inhalation von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln, wie es beispielsweise Khandoga und Mitarbeiter (2004) durch die direkte systemische Infusion von UfCP gezeigt hatten, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die Westernblot-Analyse von Leberproteinextrakten ergab keine partikelassoziierten signifikanten Veränderungen von Fibrinogenkonzentrationen, weder nach 4- noch nach 24-stündiger UfCP-Exposition (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Fibrinogenexpression in Proteinlysaten von Herzgewebe nach 4- und 24- stündiger Inhalation entweder von Reinluft oder UfCP.** Das linke Feld zeigt die detektierte Menge an Fibrinogenpolypeptid alpha, repräsentiert durch schwarze Banden. M = Marker, Bande 1 = 4-Std Inhalation Reinluft-Kontrolle, 2 = 4-Std Inhalation mit UfCP, 3 = 24-Std Inhalation Reinluft-Kontrolle und 4 = 24-Std-Inhalation mit UfCP. Die eingescannten Blots (n = 3) wurden mit der *Syngene software image* Analyse auf Signifikanz getestet. Die quantifizierten Intensitäten der Alpha-Peptid-Banden wurden auf beta-Aktin (Ladekontrolle) normalisiert und in %-Veränderung relativ zu den Kontrollen dargestellt, siehe rechtes Feld. Die weißen Balken repräsentieren Kontrollen und die schwarzen Balken die mit UfCP exponierten Gruppen. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler sind dargestellt, n = 3

Mithilfe der immunhistologischen Analyse von Lebergewebeschnitten war es möglich die Deposition von Fibrin(ogen) auf Endothelzellen und Hepatozyten von UfCP exponierten und Kontrolltieren zu zeigen, jedoch konnte kein Partikel-assoziiierter Unterschied in der Intensität der Färbung beobachtet werden (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis von Fibrin(ogen)protein von Leberschnitten.** Diese Abbildungen bzw. die roten Pfeile zeigen die Deposition von Fibrin(ogen) auf Endothelzellen von kleinen Blutgefäßen und Hepatozyten. Bilder A-B zeigen exemplarisch Leberschnitte von Kontrollmäusen und Bilder C-D die Befunde nach 4-stündiger UfCP-Exposition

## 4.2 Intraarterielle Infusion von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln (UfCP)

Der zweite Teil dieser Studie hatte das Ziel, die direkten induzierten Effekte, verursacht durch vaskulär verfügbare Partikel, auf systemischer Ebene zu charakterisieren. Über den Vergleich der extrapulmonalen Veränderungen nach der Partikelinhalation mit denen nach der Infusion sollte der Beitrag der translozierten Partikel nach der Inhalation hinsichtlich der Erzeugung der pro-entzündlichen und pro-koagulativen Effekte in den extrapulmonalen Organen ermittelt werden.

Um potenzielle direkte Effekte von indirekten Auswirkungen zu unterscheiden, die über die aus den Lungen in die Blutzirkulation freigesetzten Mediatoren ausgelöst werden, wurde un-

ter Umgehung der Lungen die retrograde Verabreichung der UfCP über die *Arteria carotis* in die Blutzirkulation durchgeführt. Bei der Auswertung wurden die Lungen eingeschlossen, um eine mögliche UfCP assoziierte Freisetzung von Mediatoren zu erkennen. Dieses experimentelle Vorgehen sollte die Auswirkungen von inhalierten ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln simulieren, die in die pulmonalen Kapillaren translozieren und dann über die linke Herzhälfte in die systemische Blutzirkulation gelangen. Je Maus wurden  $5 \times 10^7$  ultrafeine Kohlenstoffpartikel infundiert. Das entspricht mindestens der Anzahl von UfCP, die aufgrund dosimetrischer Abschätzungen innerhalb der 24-stündigen UfCP-Inhalation in die Blutzirkulation translozieren. Die biologischen Endpunkte, die 4 Stunden nach der Partikelinfusion gemessen wurden, entsprachen denen, die in der Inhalationsstudie untersucht wurden.

#### **4.2.1 Kontrollen der intraarteriellen Infusion**

Um den Effekt der Gewebepreparation (Operation), d.h. der Einführung des Katheters und der Infusion der Lösung in die *Arteria carotis*, auf die gewählten biologischen Endpunkte zu charakterisieren, wurde anstelle von partikelhaltiger Pufferlösung nur die Lösung infundiert. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen von Lungen-, Herz- und Lebergewebe, aber auch Proteinmarker von Plasmaproben analysiert. Dabei wurden die Werte aus den Reinluft exponierten Tieren gemittelt, d.h. von nicht-operierten Versuchsmäusen der Mittelwert aus den 4- und 24-Stundenwerten berechnet und mit den Werten der mit Puffer exponierten Kontrollen aus der Infusionsstudie verglichen.

##### **4.2.1.1 Proteinexpressionsanalyse**

Die Untersuchungen zeigten deutliche Veränderungen bei den meisten entzündlich relevanten Endpunkten. Tabelle 11 auf Seite 87 stellt das Vielfache der Veränderungen in der Proteinexpression in Lunge-, Herz- und Lebergewebe dar, welche durch die Infusionsapplikation relativ zu den mit Reinluft exponierten Kontrolltieren verursacht wurde. Durch den operativen Eingriff waren die Proteinkonzentrationen zahlreicher Marker in allen drei Organen erheblich angestiegen, wobei das Herz am stärksten betroffen war (Tabelle 11). Es wurde festgestellt, dass trotz aller Bemühungen, das Gewebe sorgfältig zu präparieren, der chirurgische Eingriff in einer endothelialen Antwort resultierte, mit Begleiterscheinungen wie der Mobilisierung von Leukozyten und dem Freisetzen von Entzündungsmediatoren, die sich in entsprechenden Änderungen in Plasma-Proteinkonzentrationen widerspiegeln (Seite 86, Kapitel 4.2.1.3). Es zeigte sich auch, dass einige Entzündungsmediatoren wie GM-CSF, IFN-gamma, IL-13,

IL-17, L-Selektin, PDGF, P-Selektin, Resistin TNF-RI, VCAM-1 und VEGF in vereinzelt Organen nur moderat beeinflusst waren. Darüber hinaus waren beispielsweise die Proteinkonzentrationen von Entzündungsmarkern Adiponektin, CXCL12, IL-10, PDGF-AA, PDGF-BB weder in den Lungen, noch in den Herzen, noch in den Lebern der Kontrolltiere verändert.

#### **4.2.1.2 Hämatologische Analyse**

Die Gesamtzellzahl an Leukozyten war in den mit Puffer exponierten Kontrolltieren um weniger als das 1,5-Fache aufgrund der reduzierten Zahlen von Monozyten, Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten gesunken, wohingegen die Anzahl von neutrophilen Granulozyten nicht betroffen war. Die Zellzahlen von Erythrozyten und Thrombozyten blieben nach dem chirurgischen Eingriff unberührt, während die Zellzahl von Riesenthrombozyten (Large PLT) um das 7-Fache anstieg (Tabelle 12).

#### **4.2.1.3 Entzündungsmediatoren im Plasma**

Vergleichbar mit den untersuchten Geweben waren, nur mit einem wesentlich stärkeren pro-entzündlichen Reaktionsbild, auch im Plasma zahlreiche Zytokine durch den operativen Eingriff betroffen (Tabelle 12). Während pro-entzündliche Zytokine wie CCL2, CXCL1, Fibri-nogen, G-CSF, GM-CSF, IFN-gamma, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, sICAM-1, TNF-alpha und total PAI-1 starke Induktionen erfuhren, zeigten sich Adiponektin, IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-12(p40), IL-17, MMP9 und sVCAM-1 unverändert.

#### ***Zusammenfassung der durch den chirurgischen Eingriff induzierten Effekte***

Die Untersuchungen zeigten, dass bereits die chirurgische Intervention bei den meisten biologisch relevanten Endpunkten zu deutlichen Veränderungen führte. Einige von diesen Veränderungen waren hauptsächlich ein bis zwei Zehnerpotenzen größer als die Effekte, die durch die Partikelinhalation induziert wurden (Siehe hierzu auch Kapitel 5 „Diskussion“, Seite 97 unterer Absatz sowie Seite 98).

Gewebeproteine	Lunge	Herz	Leber
Adiponektin			
CCL2			
CCL3			
CCL4			
CRP			
CXCL1			
CXCL12			
CXCL2			
E-Selektin			
GM-CSF			
ICAM-1			
IFN-gamma			
IL-1 alpha			
IL-1 beta			
IL-1ra			
IL-2			
IL-6			
IL-10			
IL-12(p40)			
IL-13			
IL-17			
L-Selektin			
MMP2			
MMP9			
Osteopontin			
PDGF-AA			
PDGF-BB			
P-Selektin			
Resistin			
TGF-beta-1			
TNF-alpha			
TNF-RI			
VCAM-1			
VEGF			

### Farbcode

x-fache Veränderung				
induziert			unverändert	reprimiert
>10	10 > x > 5	>2		<0,5

**Tabelle 11: Proteinexpression in den Zielorganen der mit Puffer exponierten Kontrollmäuse.** Die Veränderungen der Infusionskontrollen sind als ein Vielfaches relativ zu Reinluft-Kontrolltieren aus dem Inhalationsexperiment dargestellt

Hämatologie		Plasmaproteine	
RBC		Adiponektin	
WBC		CCL2	
Lympho		CCL5	
PMN		CXCL1	
Mono		E-Selektin	
EOS		Fibrinogen	
PLT		G-CSF	
Large PLT		GM-CSF	
		IFN-gamma	
		IL-1 alpha	
		IL-1 beta	
		IL-2	
		IL-4	
		IL-5	
		IL-6	
		IL-10	
		IL-12(p40)	
		IL-12(p70)	
		IL-13	
		IL-17	
		MMP9	
		sICAM-1	
		sVCAM-1	
		TNF-alpha	
		total PAI-1	

Farbcode		
x - fache Veränderung	<0,5	reprimiert
	unverändert	
	>2	induziert
	10 > x > 5	
	>10	

**Tabelle 12: Hämatologische und Plasma-Proteinmarker der Infusions-Kontrolltiere.** Die Veränderungen der Infusionskontrollen sind als ein Vielfaches relativ zu Reinluft-Kontrolltieren aus dem Inhalationsexperiment dargestellt. WBC = *white blood cells*, Neutro = *neutrophil granulocytes*, Mono = *monocytes*, Lympho = *lymphocytes*, RBC = *red blood cells*, PLT = *platelets*, Large PLT = *large platelets*.

#### 4.2.2 Pulmonale Reaktion nach Infusion von UfCP

Ziel der Untersuchung der Lungen war es, eine potenzielle Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie sie bei der Inhalation von UfCP erfolgt, auszuschließen, um sicher zu gehen, dass bei dieser Methode die systemischen Effekte ausschließlich durch die systemisch verfügbaren Partikel verursacht werden. Folglich war, wie vorgenannt, die Umgehung der Lungen und die retrograde Verabreichung der UfCP über die *Arteria carotis* in die Blutzirkulation notwendig. Zur Verifizierung wurden die Lungen mittels einer Gen- und Proteinexpressionsanalyse untersucht, um eine mögliche UfCP-assoziierte Freisetzung von Entzündungsmediatoren ausschließen zu können.

Keiner der analysierten Entzündungsmarker war im Lungengewebe nach der UfCP-Infusion auf Genexpressionsebene signifikant induziert (Seite 68, Abbildung 10). Jedoch waren die

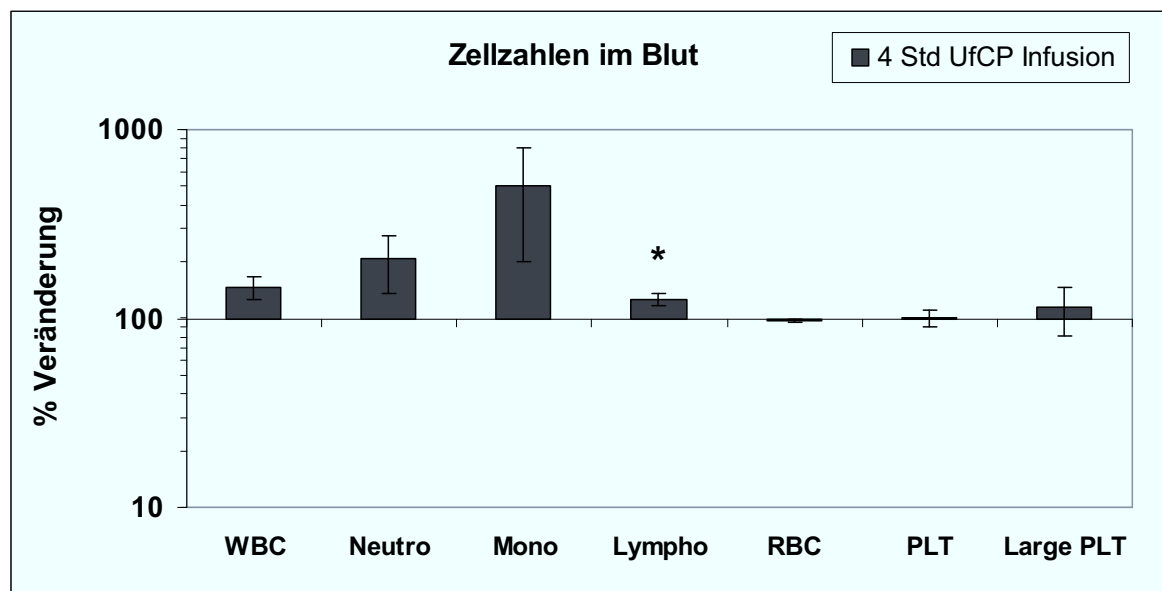
Transkripte, die für die Fibrinogenpeptide codieren, beachtlich herunterregelt (alpha, beta und gamma, > 20-fach) und ebenso, der gleichen Tendenz folgend, das Monozyten Chemokin *Ccl2* (MCP-1, > 2-fach). Ein vergleichbares Reaktionsmuster wurde auch in der Proteinexpressionsanalyse festgestellt. Keine der Entzündungsmarker waren hinsichtlich ihrer Proteinkonzentrationen signifikant induziert (Seite 70, Abbildung 11). Ebenso wie auf Genexpressionsebene zeigten sich hier die CCL2-Proteinkonzentrationen um das 2-Fache herabgesetzt. Diese Tendenz war auch für Resistin und den TNF Rezeptor 1 zu beobachten.

Zusammenfassend wurde keine signifikante Entzündungsreaktion im Lungengewebe durch die intraarterielle Infusion von UfCP festgestellt. Damit konnte die potenzielle Freisetzung von Mediatoren ausgeschlossen werden, wobei dies nun die Unterscheidung zwischen direkten und indirekten systemischen UfCP assoziierten Effekten ermöglichte.

### 4.2.3 Reaktion im Blut nach Infusion von UfCP

#### 4.2.3.1 Hämatologische Analyse

Die Erythrozyten- und Leukozytenzellzahlen (RBC und WBC, Abbildung 22) waren nach der Partikelinfusion nicht signifikant verändert, lediglich eine tendenzielle 1,3-fache Zunahme an Leukozyten war zu beobachten (ns).



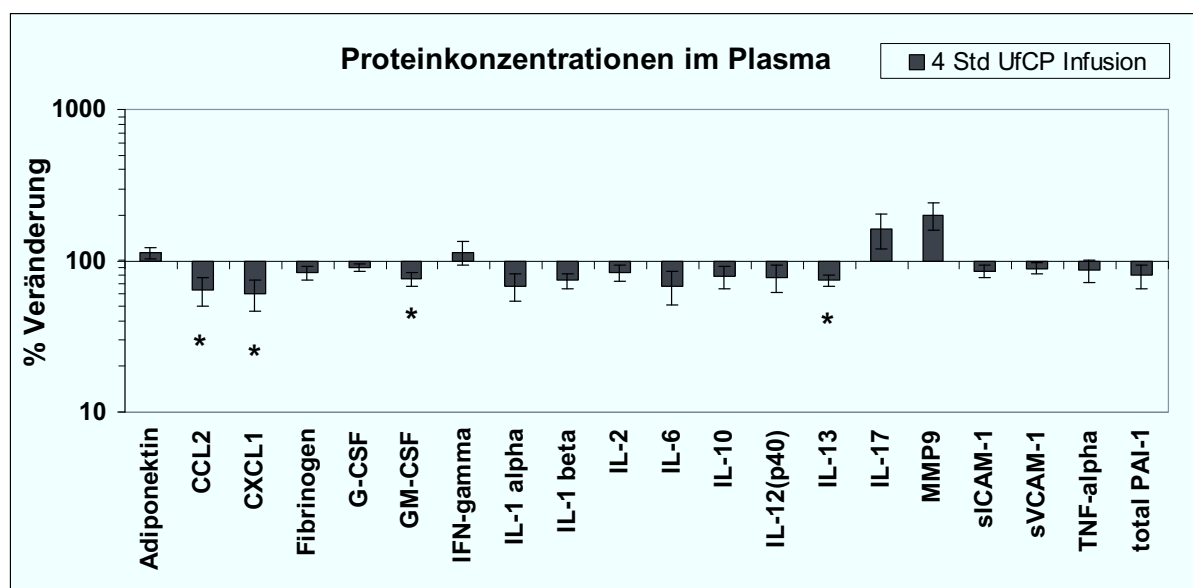
**Abbildung 22: Hämatologische Analyse von Blutproben 4 Stunden nach der intraarteriellen Infusion von UfCP.** Dargestellt sind die UfCP-assoziierten Veränderungen der Zellzahlen in Prozent relativ zu den mit Puffer exponierten Kontrollen. WBC = *white blood cells*, Neutro = *neutrophil granulocytes*, Mono = *monocytes*, Lympho = *lymphocytes*, RBC = *red blood cells*, PLT = *platelets*, Large PLT = *large platelets*. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n = 6; (\* =  $p < 0,05$ )



Durchschnittlich nahm die Anzahl der im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten (Neutro) und Monozyten (Mono) um einen Faktor von 3,5 (Neutro) und 2 (Mono) nach der Infusion von UfCP zu. Jedoch waren diese Veränderungen aufgrund der unterschiedlichen Reaktionen der Mäuse statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu konnte ein statistisch signifikanter Anstieg von Lymphozyten (Lympho) um einen Faktor von 1,3 verzeichnet werden ( $p < 0,05$ ). Die Anzahl an Thrombozyten (PLT) und Riesenthrombozyten (Large PLT) wurde durch die Partikelinfusion nicht beeinflusst.

#### 4.2.3.2 Analyse von Entzündungsmediatoren im Plasma

Während die meisten der 21 untersuchten Zytokine im Plasma nach der Infusion von UfCP herabgesetzte Konzentrationen aufwiesen, zeigten sich nur einige tendenziell erhöht (Abbildung 23). Zu den Letzteren gehören IL-17 und MMP9, deren 1,5-fach erhöhte Veränderung jedoch statistisch nicht signifikant war. Im Gegensatz dazu gab es 4 Zytokine, CCL2 (MCP-1), CXCL1 (KC), GM-CSF und IL-13, deren Konzentrationen partikelassoziiert bis zu 1,3-fach herabgesetzt waren ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 23: Analyse von Plasmaproben nach der intraarteriellen Infusion.** UfCP-assoziierte Veränderungen in den Proteinkonzentrationen sind dargestellt als Prozent relativ zu den mit Puffer exponierten Kontrollen. Das Diagramm zeigt Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 6$ ; (\*:  $p < 0,05$ )

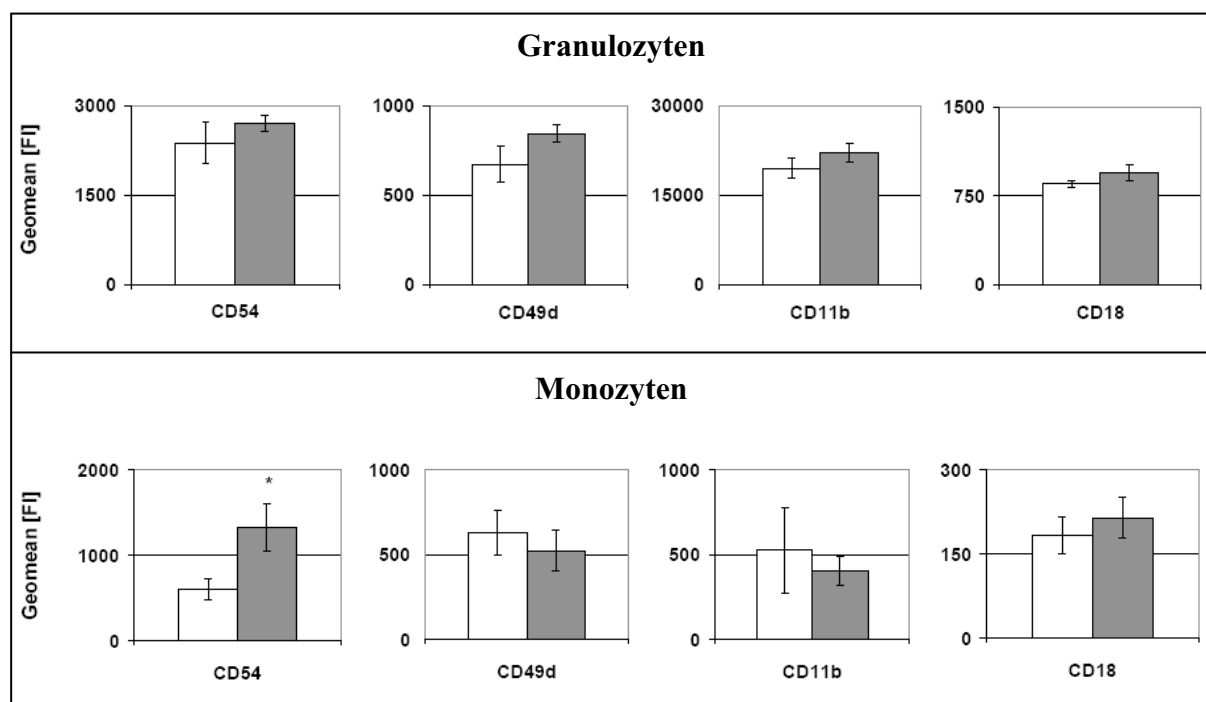
Es wurden auch spezifische Marker für eine kardiovaskuläre Erkrankung wie Fibrinogen, sE-Selektin, sICAM-1, sVCAM-1 und total PAI-1 im Plasma untersucht. Die gemessenen sE-Selektin-Konzentrationen der einzelnen Proben lagen unterhalb des Detektionsbereiches und zeigten sich außerhalb bzw. kleiner als der messbare Konzentrationsbereich und wurden daher



in der Abbildung 23 nicht aufgeführt. Für die verbleibenden Analysen wurden keine signifikanten Veränderungen beobachtet.

#### 4.2.3.3 Analyse von Leukozytenaktivierung mittels FACS

Die Expressionsanalyse der Zelloberflächenrezeptoren auf Granulozyten aus der Blutzirkulation ergab keine UfCP-assoziierten Effekte (Abbildung 24). Bei der Untersuchung von Monozyten konnte ein signifikanter Anstieg der CD54-(ICAM-1)-Expression um einen Faktor von 2 detektiert werden, während andere Oberflächenmoleküle keine statistisch signifikante Veränderungen aufzeigten.



**Abbildung 24: Durchflusszytometrische-Analyse (FACS) von Blutproben nach intraarterieller Infusion von Pufferlösung oder UfCP.** Dargestellt ist das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität (Geomean FI) von den Adhäsionsmolekülen CD54, CD49d, CD11b und CD18 auf Granulozyten und Monozyten. UfCP-assoziierte Änderungen in der Expression von Zelloberflächenmolekülen (schwarze Balken) werden im Vergleich zu mit Puffer exponierten Kontrollen gezeigt (weiße Balken). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 6$ ; (\*:  $p < 0,05$ )

#### 4.2.4 Reaktion im Herz nach Infusion von UfCP

##### 4.2.4.1 Genexpressionsanalyse

Nahezu alle Entzündungsmarker zeigten entweder keine Änderung oder eine Repression ihrer Transkripte nach der Infusion von Partikeln (Seite 68, Abbildung 10). In der Tat konnte eine 1,5-fache Induktion nur für Osteopontin (*Spp1*) und Glutation-S-transferase-Transkripte

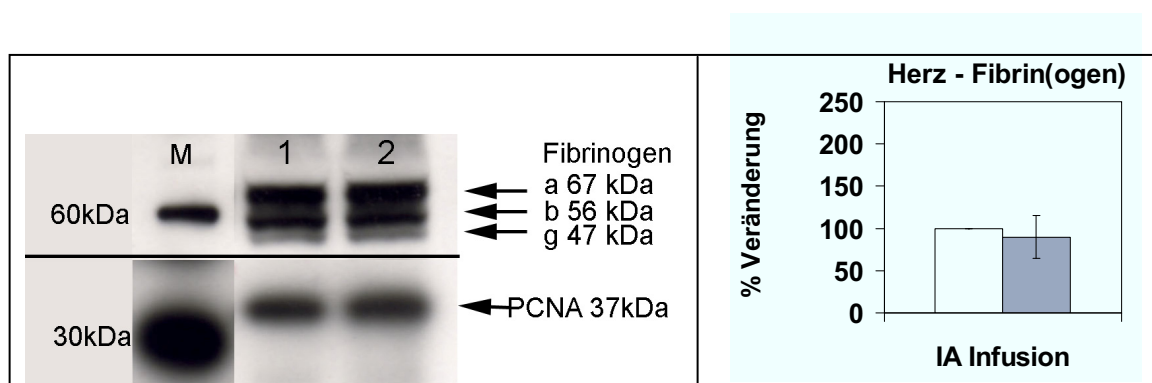
(*Gsta1*) festgestellt werden. Letztere kann zusammen mit einem 1,4-fachen Anstieg von Hä-moxigenase 1 (*Hmox1*)-Transkripten als Hinweis auf eine dort vorherrschende oxidative Stressreaktion gewertet werden. Die Transkriptexpression von den Zytokinen *Il1a*, *Il6* und *Cxcl5* war um 1,5 bis 5-fach reprimiert. Dies gilt auch für Entzündungsmarker wie Fibrinogen (*Fga*, *Fgb*, *Fgy*), Serum Amyloid A3 (*Saa3*) und den Rezeptor für oxidiertes LDL (*Olr1*).

#### 4.2.4.2 Proteinexpressionsanalyse

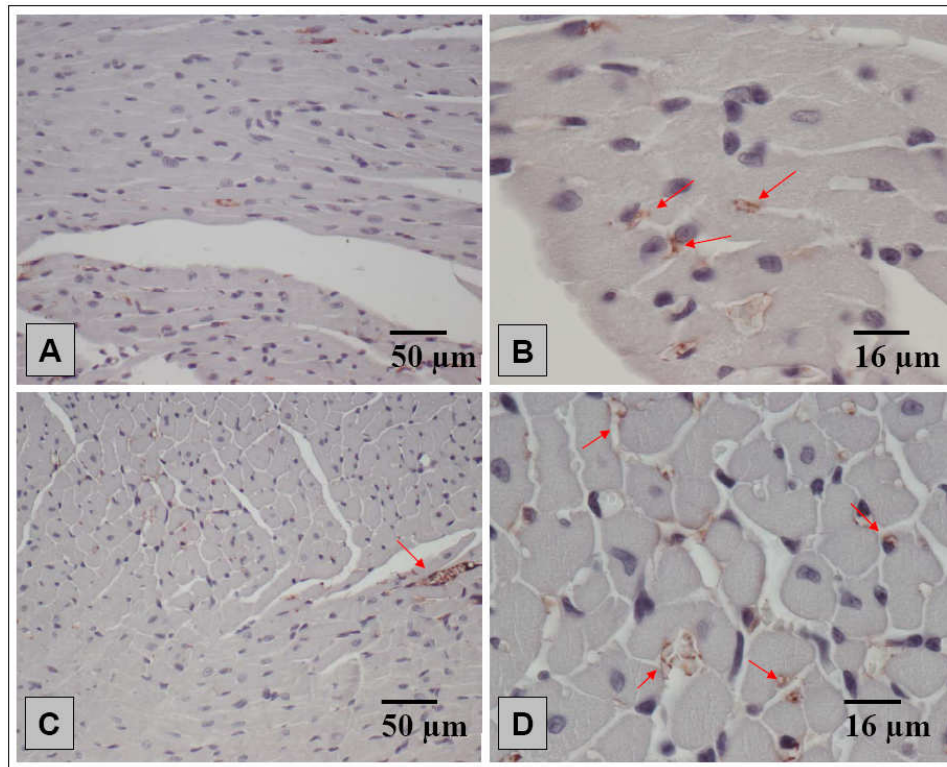
Die Untersuchung auf Proteinebene in den Herzgeweben ergab in der Gesamtheit keine UfCP-assoziierten Veränderungen nach der Infusion von UfCP. Die Proteinkonzentrationen von nur 2 Markern, TGF-beta-1 und E-Selektin, waren nach der Partikelexposition mehr als 1,5-fach herabgesetzt (Seite 70, Abbildung 11).

#### 4.2.4.3 Fibrin(ogen)deposition im Herz

Beide, die Westernblot-Analyse (Abbildung 25) und die immunhistochemische Färbung von Herzgewebeschnitten ergaben 4 Stunden nach Partikelinfusion keinen Hinweis auf erhöhte Deposition von Fibrin(ogen) in den Kapillaren des Herzens (Abbildung 26).



**Abbildung 25: Fibrin(ogen)expression in Proteinlysaten von Herzgewebe 4 Stunden nach der Infusion von Pufferlösung oder UfCP.** Das linke Feld zeigt die detektierte Menge an Fibrin(ogen)polypeptide alpha, beta und gamma, repräsentiert durch schwarze Banden. M = Marker, Bande 1 = 4- Std nach Infusion von KHP-Lösung, 2 = 4-Std nach Infusion von UfCP. Die eingescannten Blots (n = 3) wurden mit der *Syngene software image* Analyse auf Signifikanz getestet. Die quantifizierte Intensitäten der Alpha-Peptid-Banden wurden auf PCNA (Ladekontrolle) normalisiert und in %-Veränderung relativ zu den Kontrollen dargestellt, siehe rechtes Feld. Die weißen Balken repräsentieren Kontrollen und die schwarzen Balken die mit UfCP exponierten Gruppen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt, n = 3



**Abbildung 26: Immunhistochemischer Nachweis von Fibrin(ogen)expression in Herzschnitten von mit Puffer- und UfCP-exponierten Mäusen.** Diese Abbildungen bzw. die roten Pfeile zeigen die Deposition von Fibrin(ogen) auf Endothelzellen von kleinen kapillaren Blutgefäßen, wobei keine UfCP assoziierten Unterschiede zu beobachten waren. Bilder A-B zeigen exemplarisch Herzgewebeschnitte von Kontrollmäusen und Bilder C-D diese von Mäusen 4 Stunden nach UfCP-Infusion

#### 4.2.5 Reaktion in der Aorta nach Infusion von UfCP

Ebenso wie in der Inhalationsstudie war die geringe verfügbare Menge von Aortagewebe für die nachfolgenden Untersuchungen limitierend. Demnach wurde vergleichend zur Inhalationsstudie der Schwerpunkt auf die Genexpressionsanalyse gelegt. Der stärkste UfCP bedingte Anstieg von Transkripten konnte für die pro-entzündlichen Zytokine *Cxcl1*, *Csf2* und *Il6* beobachtet werden, die 1,5- bis 6,6-fach induziert waren (Seite 68, Abbildung 10). Leukozytäre Zellmarker wie Osteopontin (*Spp1*), COX2 (*Ptgs2*) und *Ly6g* waren über 2-fach induziert. Erhöhte Expressionen zeigten sich für *Vcam1*, *Cd40lg* und in einem geringeren Maß für *tissue factor* (*F3*) und den von-Willebrand-Faktor (*Vwf*). Daraus lässt sich eine durch systemisch infundierte UfCP induzierte Endothelaktivierung und prokoagulative Situation ableiten.

Darüber hinaus waren die oxidativen Stressmarker *Hmox1* und *Gclc* um 1,5- und 1,7-fach induziert, wohingegen die Transkripte von allen 3 Fibrinogengenen (*Fga*, *Fgβ* und *Fgγ* inklusive *Tnf* und *Il10*) zweifach reprimiert waren.

## 4.2.6 Reaktion in der Leber nach Infusion von UfCP

### 4.2.6.1 Genexpressionsanalyse

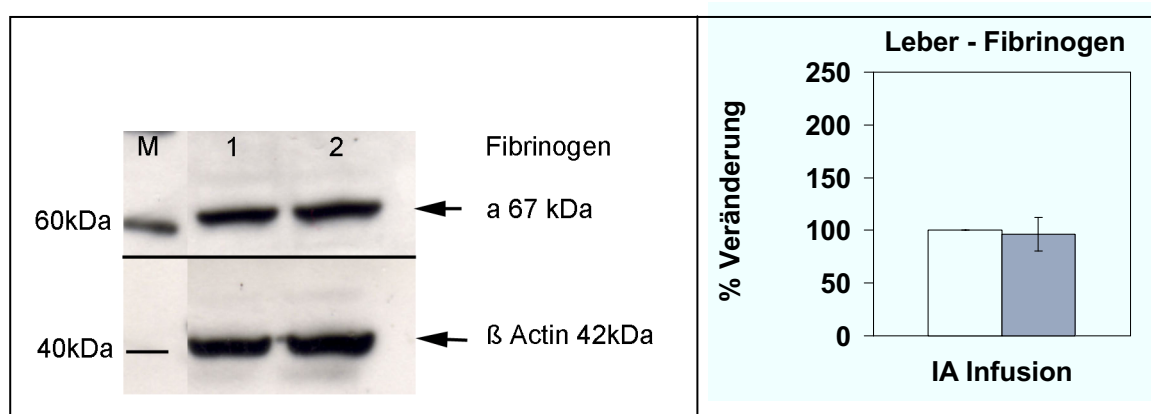
Die Expression keiner der untersuchten Marker war nach der Partikelinfusion signifikant induziert (Seite 68, Abbildung 10). Im Gegensatz dazu waren zahlreiche Marker, die für eine Entzündungsreaktion relevant sind, wie zum Beispiel *Edn1*, *Thbs1*, *Vcam1*, *Alox5*, *Pecam1*, *Cxcl5*, *Il6* und *Ccl2* über 2-fach reprimiert.

### 4.2.6.2 Proteinexpressionsanalyse

Den mRNA-Daten entsprechend wurden die meisten der untersuchten Marker durch die Partikelinfusion auch auf Proteinebene nicht beeinflusst, mit den Ausnahmen von TNF-RI und L-Selektin, welche mehr als 1,5-fach angestiegen waren (Seite 70, Abbildung 11).

### 4.2.6.3 Fibrin(ogen)deposition in der Leber

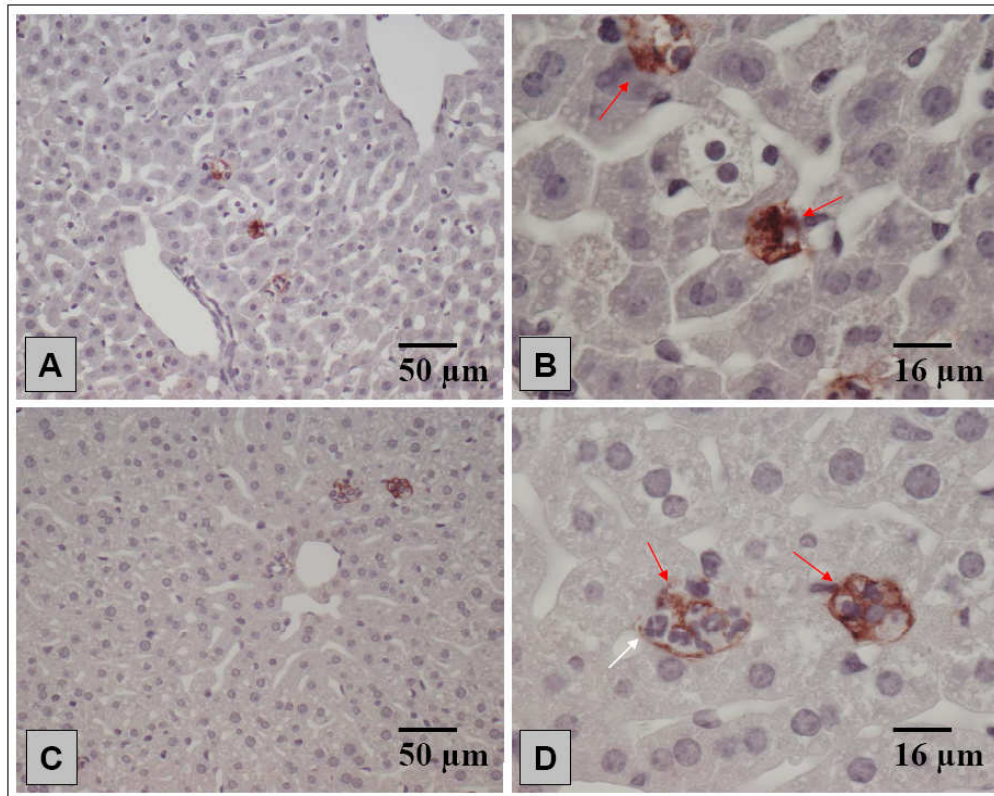
Die Westernblot-Analyse ergab keine UfCP-assoziierten Veränderungen in den Leberprotein-extrakten, weder in der Expression noch in der Deposition von Fibrinogen (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Westernblot der Fibrinogenexpression in Proteinlysaten von Lebergewebe 4 Stunden nach der Infusion von KHP-Lösung oder UfCP (linkes Feld).** Das linke Feld zeigt die detektierte Menge an Fibrin(ogen)polypeptide alpha, repräsentiert durch schwarze Banden. M = Marker, Bande 1 = 4-Std nach Infusion von KHP-Lösung, 2 = 4-Std nach Infusion von UfCP. Die quantifizierte Intensitäten der Alpha-Peptid-Banden wurden auf beta-Aktin (Ladekontrolle) normalisiert und in %-Veränderung relativ zu den Kontrollen dargestellt, siehe rechtes Feld. Die weißen Balken repräsentieren Kontrollen und die schwarzen Balken die mit UfCP exponierten Gruppen. Es sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dargestellt,  $n = 3$

Die immunhistologische Analyse von Lebergewebeschnitten bestätigte ebenso das Ergebnis aus der Westernblot-Analyse, wobei keine deutlichen Unterschiede zwischen den Kontroll- und den Infusionstieren zu beobachten waren. In beiden Gruppen (Kontroll- und UfCP-

Exposition) konnte jedoch unabhängig von der Infusion von UfCP eine Fibrin(ogen)deposition in der sinusoidalen Region detektiert werden (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Immunhistochemischer Nachweis von Fibrin(ogen)protein von Leberschnitten.** Diese Abbildungen bzw. die roten Pfeile zeigen die Fibrin(ogen)deposition in der sinusoidalen Region von mit Pufferlösung oder UfCP exponierten Mäusen. Bilder A-B zeigen exemplarisch Leberschnitte von Kontrollmäusen und Bilder C-D diese von Mäusen 4 Stunden nach UfCP-Infusion

## 5 Diskussion

Epidemiologische sowie experimentelle toxikologische Studien bestätigen die Arbeitshypothese, dass die systemischen entzündlichen Effekte, die durch die Inhalation von hohen Partikelkonzentrationen verursacht werden, eine Aktivierung des vaskulären Endothels sowie einen pro-koagulativen Zustand fördern. Gerade diese Prozesse tragen zu einer Verschlimmerung kardiovaskulärer Erkrankungen wie zum Beispiel Artherosklerose, wodurch es zunächst zu einer erhöhten Destabilisierung artherosklerotischer Plaques kommen kann, die meist einen Herzinfarkt zur Folge hat (Seaton et al., 1995; Delfino et al., 2005; Salvi et al., 1999; Suwa et al., 2002; Sun et al., 2005). Bis heute ist es unklar, ob die extrapulmonalen Effekte in den sekundären Zielorganen nach der Inhalation „direkt“ durch translozierte, von den Lungen in die Blutzirkulation gewanderten ultrafeinen Partikel (UfP) vermittelt werden, oder ob die durch die Inhalation von UfP induzierte Lungenentzündung, mit dem Freisetzen von Mediatoren in die Blutzirkulation, ausschlaggebend für das Verursachen der systemischen Effekte ist („indirekter“ Wirkungsweg). Der Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchungen lag auf beiden partikulären Wirkungswegen über das Blut. Die Untersuchung von weiteren Wirkungswegen, beispielsweise über die Lymphe, sowie eine Wirkung über das autonome Nervensystem, war zur Beantwortung der Fragestellung „direkter“ oder „indirekter“ partikulärer Wirkungsweg in der vorliegenden Studie nicht von Bedeutung und wurde daher ausgeschlossen. Um diese Fragestellung der partikulären Wirkung über die Blutzirkulation zu bearbeiten, wurden zwei unterschiedliche Expositionsmodelle, die Inhalation und die Infusion, gewählt. Über den Vergleich der untersuchten Endpunkte bzw. deren Reaktionsmuster sollte eine Unterscheidung zwischen „direkten“ und „indirekten“ Partikeleffekten ermöglicht werden und dies sollte die Relevanz der direkten systemischen Partikelwirkung für die Inhalation von Partikeln aufzeigen. Darauf hatten zahlreiche Studien bereits hingewiesen (Kreyling et al., 2002; Oberdörster et al., 2002; Nemmar et al., 2002; Khandoga et al., 2004). Für die zwei Expositionsmodelle wurden zum Einen das Ganzkörperinhalationsexperiment entsprechend der Studie von Andre und Mitarbeiter (2006) gewählt, bei dem direkte sowie indirekte Effekte erfolgen. Zum Anderen fiel in der vorliegenden Arbeit die Entscheidung auf die intraarterielle Infusion (Khandoga et al., 2004), bei der direkte systemische Effekte durch eine direkte Partikelwirkung erfolgen.

### *Methodische Aspekte*

Vergleichbar zu der Inhalationsstudie von Andre und Mitarbeitern (2006), wurden pulmonale

und darüberhinaus extrapulmonale Effekte nach 4- und 24-stündiger Inhalation von ultra feinen Kohlenstoffpartikeln (UfCP, Massenkonzentration =  $440 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , Anzahlkonzentration =  $6,4 \times 10^6 \text{ cm}^{-3}$ ) untersucht und mit den Ergebnissen 4 Stunden nach der intraarteriellen Infusion von UfCP verglichen. Die Partikeldosis für die Infusion wurde zunächst anhand aktueller dosimetrischer Daten abgeschätzt (Kreyling et al., 2002; Semmler et al., 2004; Khandoga et al., 2004; Alessandrini et al., 2008), siehe dazu auch Seite 40, Kapitel 3.2.1.3.2. Diese von uns berechnete Partikeldosis lag sehr nahe im Bereich der verwendeten Partikeldosis von  $5 \times 10^7$  UfCP von der bereits publizierten Arbeit von Khandoga und Mitarbeiter (2004). Um eine weitgehende Vergleichbarkeit herzustellen, haben wir uns dann für die Verwendung derselben Partikeldosis wie Khandoga und Mitarbeiter (2004) entschieden. Diese Partikeldosis entspricht der Anzahl der translozierten und damit im Blut systemisch verfügbaren Partikel nach 24-stündiger Inhalation von UfCP.

Die intraarteriell applizierte und damit „translozierte“ Dosis entspricht zwar rechnerisch der gleichen Größenordnung, jedoch ist die intraarterielle Partikelbelastungsspitze erheblich größer als im Vergleich zum Inhalationsweg, da die Partikeldosis direkt und innerhalb von Minuten in die Blutzirkulation infundiert wird und nicht akkumulierend über eine 24-stündige Inhalation. Daraus wäre zu vermuten gewesen, dass im Vergleich zum Inhalationsexperiment nach der Partikelinfusion ein stärkeres Reaktionsbild hätte erwartet werden können.

Obwohl es technisch und operativ schwieriger ist, wurde der intraarterielle dem intravenösen Applikationsweg vorgezogen, da der arterielle Weg im Gegensatz zum intravenösen Infusionsweg dem Weg der inhalierten und in die systemische Blutzirkulation translozierten Partikel gleicht. Elder und Mitarbeiter (2007) fanden heraus, dass sich das systemische Verteilungsmuster von intravenös infundierten Partikeln von dem der translozierten Partikel nach der Inhalation (arterieller Weg) unterscheidet (Elder et al., 2007). Diese Studie zeigte, dass ein Teil der intratracheal und damit arteriell verfügbaren UfP ausschließlich in der Leber zu finden war, wohingegen nach der intravenösen Verabreichung die Partikel größtenteils in der Niere, in der Milz, im Blut und weniger in der Leber zu detektieren waren. Diese Tatsache erklärt, dass für den hier geplanten Vergleich der systemischen Effekte (Inhalation versus Infusion) die intraarterielle Applikation unumgänglich war.

Allein der chirurgische Eingriff, der für die intraarterielle Infusion notwendig war, induzierte jedoch eine signifikante Entzündungsreaktion im Blut und in den untersuchten Zielorganen. Von einigen untersuchten Markern in den jeweiligen Organen und vor allem von Markern aus der Blutzirkulation dieser Tiere waren die Konzentrationen der Marker ein oder zwei Zehnerpotenzen größer als im Vergleich zu den Werten der Kontrolltiere der Inhalation (Seite 87,



Tabelle 11 und Seite 88, Tabelle 12). Diese Tatsache stellte eine große Herausforderung für die Interpretation der Effekte, die mit der intraarteriellen Infusion von UfCP assoziiert werden sollten, dar. In der derzeitigen partikeltoxikologischen Literatur ist bislang nicht beschrieben, ob und wie solch eine Veränderung in den Basalwerten die Reaktivität des Organismus auf zusätzliche Stimuli wie zum Beispiel infundierte UfCP beeinflusst. Die vertiefte Analyse der vorliegenden Daten zeigte aber, dass eine vollständige Unterdrückung der Partikeleffekte durch die chirurgische Intervention ausgeschlossen werden konnte, da in den Infusionskontrollen sowohl induzierte (CCL2, CXCL1, GM-CSF und TNF-alpha) als auch nicht induzierte (IL-1 alpha, IL-12(p40), MMP9 und sVCAM-1) Entzündungsmarker im Blut ein vergleichbares partikelassoziiertes Reaktionsbild (Partikeleffekte) aufzeigten, so wie es nach der UfCP-Inhalation zu beobachten war (Seite 88, Tabelle 12; Seite 90, Abbildung 23 und Seite 77, Abbildung 16). Ebenso zeigten einzelne Marker, die in den untersuchten Organen durch die Operation sowohl beeinflusst als auch unbeeinflusst waren (GM-CSF, P-Selektin, MMP2 und TNF-alpha), nach der UfCP-Infusion keine Veränderung (Seite 87, Tabelle 11 und Seite 70, Abbildung 11). Auch Entzündungsmarker wie Adiponektin, CXCL1, IL-10 und PDGF waren weder durch die chirurgische Intervention noch nach der Partikelexposition beeinflusst. Diese Tatsachen ergaben für die Interpretation der Partikeleffekte nach der Infusion letztlich eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit, dass ein Vergleich der systemischen Partikeleffekte der Inhalations- versus Infusionsexpositionen valide ist. Demnach erfolgte die Datenanalyse der intraarteriellen Infusion nach den gleichen Kriterien, die schon für die Daten der Partikelinhalation Verwendung fanden.

## **5.1 Pulmonale und systemische Effekte nach Inhalation von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln (UfCP)**

### **5.1.1 Gesamtbild der pulmonalen Reaktion**

Die Inhalation von UfCP in BALB/cJ-Mäusen induzierte eine frühe pro-entzündliche Reaktion, die bereits nach 4-stündiger UfCP-Exposition durch erhöhte pro-entzündlicher Zytokin-konzentrationen wie TNF-alpha, IL-1 und IL-6 und durch die Rekrutierung von Makrophagen in den alveolären Bereich charakterisiert war. Die Beteiligung der kapillaren Blutgefäße war durch den Anstieg der Gesamtproteinkonzentration in der BAL-Flüssigkeit, die indikativ für eine erhöhte Permeabilität der vaskulären Endothelzellen steht (Ratjen et al., 1999), sowie durch Endothelaktivierungsmarker (VCAM-1 und E-Selektin) und durch die beobachtete Fibrin(ogen)deposition in den kleinen Blutgefäßen und in den septalen Kapillaren zu belegen



(Idell et al., 1994; Idell et al., 2003). In diesem Zusammenhang wurden zum gleichen Zeitpunkt erhöhte Zellzahlen von Makrophagen in der BAL-Flüssigkeit detektiert, die auf eine Transmigration von Monozyten aus der Blutzirkulation hinweisen. Salvi und Mitarbeiter (1999) beobachteten ebenso eine durch die Partikel ausgelöste alveolare Entzündung, die mit einer Aktivierung von Endothelzellen (VCAM-1 und ICAM-1) in der Lunge, mit einer Rekrutierung von Leukozyten und mit nekrotischen Prozessen (LDH) einher ging. Darüberhinaus wurde ebenso ein Anstieg von Makrophagen beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit waren jedoch zahlreiche pro-entzündliche Gene zum frühen Untersuchungszeitpunkt herunterreguliert (Seite 68, Abbildung 10). Dazu gehörten auch die, die mit der Epithel- und Endothelaktivierung, der Produktion von Entzündungsmediatoren, der Akkumulation von Leukozyten oder oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden. Demgegenüber war zeitgleich auf Proteinebene ein eindeutiges entzündliches Reaktionsbild zu beobachten, da sämtliche pro-entzündliche und pro-koagulative Zytokinkonzentrationen angestiegen waren. Eine mögliche Erklärung für diesen vermeintlichen Widerspruch wäre, dass zu diesem Zeitpunkt (4 Stunden) auf transkriptioneller Ebene bereits hemmende, anti-entzündliche Mechanismen abliefen, die möglicherweise durch eine erhöhte Konzentration des anti-entzündlich wirkenden Interleukin-10 verursacht wurden (Riley et al., 1999). Nach 24-stündiger Partikelexposition zeigten sich, abgesehen von den erhöhten Zytokinkonzentrationen auf Proteinebene, einige Entzündungsmarkergene induziert (Seite 68, Abbildung 10). Die parallele Induktion von IL-10 auf Gen- und Proteinebene weist auch hier darauf hin, dass zu gleicher Zeit ebenso anti-entzündliche Mechanismen aktiviert wurden, wobei das pro-/anti-entzündliche Gleichgewicht eindeutig auf Seiten der entzündungsfördernden Reaktion lag (Seite 70, Abbildung 11). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass alveolare Epithelzellen die Hauptquelle des neutrophilen chemotaktischen CXCL1 Chemokins nach der UfCP-Exposition sind. Die Freisetzung von CXCL1 in das alveoläre Lumen wurde mit einer moderaten neutrophilen Zellrekrutierung in die Lungen assoziiert. Vergleichbare Beobachtungen hatten auch schon Andre und Mitarbeiter (2006) nach 24-stündiger Inhalation von UfCP festgestellt. Auch Salvi und Mitarbeiter (2000) zeigten auf mRNA- und Proteinebene in einer Folgestudie, dass humane Lungenepithelzellen die Chemokine IL-8 und Gro-alpha, homolog zum Maus Chemokin CXCL-1, synthetisieren, welche für die Infiltration von Leukozyten in das Lungengewebe relevant sind. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die inhalative UfCP-Exposition die erwartete, pulmonale Entzündungsreaktion, die von einer Endothelaktivierung aber auch von pro-thrombotischen Reaktionen geprägt war, induzierte. Ebenso wurde in diesem Rahmen eine begleitende anti-entzündliche Reaktion zum frühen Untersu-

chungszeitpunkt beobachtet, dies jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß.

### 5.1.2 Effekte auf biologische Marker im Blut

Das pulmonale Gefäßbett sowie das Blut stellen unter anderem die Verbindung zwischen den sekundären Organen und der Lunge, dem primär exponierten Organ, her. Das komplexe Szenario, welches durch die Inhalation von UfCP in der Lunge induziert wurde, ließ vermuten, dass pro-entzündliche sowie anti-entzündliche Reaktionen ausgelöst wurden. Die hämatologische Analyse ließ nach 4-stündiger Exposition einen deutlichen Anstieg von Thrombozyten sowie von Riesenthrombozytenzellzahlen (*large platelets*) erkennen, der bei längerer, 24-stündiger UfCP-Exposition allmählich wieder abnahm. Darüberhinaus wies die Abnahme des gemessenen MPC auf einen erhöhten Aktivierungszustand der Thrombozyten hin (Ahnadi et al., 2003). Diese Beobachtung wurde zeitgleich durch die erhöhte Fibrin(ogen)deposition in der Lunge sowie die dort erhöhte Gefäßpermeabilität auf Grund der vorherrschenden Entzündungsreaktion ergänzt und bestätigt im Gesamtbild eine mit der Entzündungsreaktion gekoppelte frühe Thrombozytenaktivierung sowie eine prothrombotische Reaktion (Idell et al., 1994; Idell et al., 2003; Cascio et al., 2007). Auch die angestiegenen Proteinkonzentrationen von beispielsweise ICAM-1 und VCAM-1 in der Lunge, sowie von PDGF-A, freigesetzt von aktivierten Thrombozyten, und von VEGF, welcher zur Angiogenese in den Lungen beiträgt, ergänzen dieses Gesamtbild. In den Studien von Cascio, Cozzi und Mitarbeiter (Cascio et al., 2007; Cozzi et al., 2007) wurde ebenfalls von erhöhten Thrombozytenzahlen nach intrapulmonaler Applikation hoher Dosen von ultrafeinen Partikeln berichtet. Diese Beobachtung wurde mit einer pulmonalen Entzündungsreaktion, einem Anstieg von Endothelaktivierungsmarkern (sP-Selektin) sowie einer verkürzten Blutungszeit und einer Thrombozytenaktivierung assoziiert.

In der vorliegenden Arbeit ließ die hämatologische Analyse zum frühen Untersuchungszeitpunkt einen leichten Anstieg von peripheren Blutmonozyten erkennen, der mit einem tendenziellen Anstieg der Zelloberflächenexpression des Leukozyten-Adhäsionsmoleküls CD11b einherging. Dieses Integrin, Teil des MAC-1 Rezeptors, ist für die leukozytäre Adhäsion über ICAM-1 am Endothel erforderlich (Laudana et al., 2006; Elangbam et al., 1997). Ungeachtet der fehlenden statistischen Signifikanz lässt sich aus pathophysiologischer Sicht die moderate Mobilisierung und die Aktivierung der Monozyten dem beobachteten Anstieg von Makrophagen in der BAL zuordnen. Die pulmonale Endothelaktivierung und der damit verbundene lokale Konzentrationsanstieg von Zytokinen wie *monocyte chemotactic peptide-1* (MCP-1) unterstützen die Hypothese einer Infiltration von Monozyten in den alveolaren Raum der Lun-

gen. Diese Vorgänge sind in Studien an Entzündungsmodellen, in denen eine Infiltration von Monozyten mit dem Anstieg des MCP-1 Chemokins (CCL2) korreliert, gut belegt (Grandaliano et al., 1997; Schwarz et al., 2004). Nach 24-stündiger Inhalation von UfCP war im Blut ein zellulärer Anstieg von peripheren neutrophilen Granulozyten und Monozyten zu beobachten. Wie von van Eeden und Mitarbeiter (2005) diskutiert wurde, könnte diese Zunahme eine Aktivierung von Progenitorzellen des Knochenmarks bedeuten, gefolgt durch eine Mobilisierung von neuen Lymphozyten in die Blutzirkulation. Aus pathophysiologischer Sicht werden im Rahmen einer pulmonalen Entzündungsreaktion die im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten, die die pulmonalen Kapillaren passieren, von Mediatoren und der direkten Wechselwirkung mit Endothelzellen aktiviert (Laudana et al., 2006). Nach der Diapedese wandern die Leukozyten entlang den von Alveolarepithelzellen freigesetzten chemotaktischen Gradienten (Chemokine) in das alveolare Lumen (Laudana et al., 2006; Andre et al., 2006). Dies würde den beobachteten Anstieg von neutrophilen Granulozyten sowie von CXCL1 in den Lavageproben nach 24-stündiger Inhalation von UfCP erklären, was von Andre und Mitarbeiter (2006) schon berichtet wurde. Im Rahmen dieser Mechanismen sollte der in der Blutzirkulation verbleibende Pool an Leukozyten weniger aktivierte Granulozyten und Monozyten enthalten (Frampton et al., 2006). Gerade dies wurde in der vorliegenden Studie nach 24-stündiger UfCP-Exposition beobachtet: die leukozytäre Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen wie Integrin CD49d, dem Homodimer des VLA-4 Rezeptors, und CD11b bzw. CD18, den beiden Integrinen, die den heterodimeren MAC-1 Rezeptor bilden, waren signifikant herabgesetzt. Frampton und Mitarbeiter (2006) stellten bei Probanden eine Veränderung in der Verteilung von peripheren Leukozyten im Blut und eine Expressionsabnahme von Adhäsionsmolekülen nach der Inhalation von ultrafeinen Kohlenstoffpartikeln fest. Dabei wurde die Abnahme der Adhäsionsmoleküle mit einer erhöhten Retention der aktivierten Leukozyten im pulmonalen Gefäßbett erklärt.

Darüber hinaus beschrieben van Eeden und Mitarbeiter (2005) in ihrer Übersichtsarbeit, dass unter anderem die Stimulierung des Knochenmarks nach der Inhalation von hohen Partikeldosen mit erhöhten zirkulierenden Konzentrationen von IL-1 beta und IL-6 zusammenhängt. Demgegenüber wurde in der vorliegenden Studie nach der Partikelinhalation in der Blutzirkulation eine Konzentrationsabnahme von IL-1 beta und IL-6 beobachtet. Einige wenige Marker im Blut waren tendenziell erhöht (ns), aber die meisten zeigten herabgesetzte Konzentrationen wie es für MCP-1 (CCL2), CXCL1, G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6 und TNF-alpha beobachtet wurde. Interessanterweise wurde in der vorliegenden Studie dennoch ein pro-entzündlicher Zustand beobachtet, der nach 4-stündiger Exposition in einigen Zielorganen gegenwärtig war

und aus den erhöhten Zytokinkonzentrationen in den Lungen (GM-CSF, IL-1 beta, IL-6, IL-17 und TNF-alpha) und zum Teil in der Leber (IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-2, CRP und TNF-alpha) gefolgert werden konnte. Diese Ergebnisse widersprechen demnach nicht vollkommen den Ergebnissen von van Eeden (2005), werfen aber zugleich die Frage auf, welche Faktoren die Stimulierung der hämatopoietischen Progenitorzellen des Knochenmarks und die Mobilisierung der Leukozyten vermittelt haben könnten.

Auch die in der vorliegenden Untersuchung herabgesetzten Konzentrationen der zahlreichen Zytokine im Plasma bleiben noch ungeklärt. Ein möglicher Mechanismus, der bei einer Stressreaktion zu diesem anti-entzündlichen Reaktionsbild führen könnte, wäre ein Konzentrationsanstieg von Glucocorticoiden wie zum Beispiel Cortisol im Blut. Dazu ist beschrieben, dass Glucocorticoide die Synthese von pro-entzündlichen Zytokinen hemmen (Almawi et al., 2001; Prigent et al., 2004). Die Inhibition erfolgt durch die direkte Wechselwirkung des Glucocorticoid-Rezeptorkomplexes und den Glucocorticoid *responsive elements* der DNA, sowie durch die Inhibition von Transkriptionsfaktoren wie NFκB vermittelt durch IκB und AP-1 (*activator protein-1*). Jedoch wurden in der vorliegenden Studie die Konzentrationen von Glucocorticoiden nicht untersucht. Daher bleibt dies Gegenstand für zukünftige Untersuchungen.

### **5.1.3 Reaktionen in sekundären Zielorganen induziert durch Inhalation von UfCP**

#### **5.1.3.1 Reaktion in der Aorta**

In epidemiologischen und toxikologischen Studien gilt die Aorta als besonderes Untersuchungsziel hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen wie Artherosklerose. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich mittels der Genexpressionsanalyse, dass die Aorta im Vergleich zu den anderen untersuchten Organen nach der UfCP-Inhalation am stärksten reagierte. Zum frühen Untersuchungszeitpunkt (nach 4 Stunden) wurden die meisten Gene nur marginal beeinflusst oder unverändert exprimiert, einige Gene fanden sich sogar herunterreguliert. Demgegenüber wurde nach 24-stündiger UfCP-Exposition bei nahezu allen untersuchten entzündungsrelevanten Markergenen eine Induktion festgestellt. Einige Transkripte, darunter waren Fibrinogen-alpha, -beta und -gamma (*Fga*, *Fgb*, *Fgy*), Endothelin-1 (*Edn1*) und das *Cxcl-5* Chemokin, waren um mehr als den Faktor 10 angestiegen. Diese Entzündungsreaktion beinhaltete ebenso einen 2-fachen Anstieg von Markern, wie zum Beispiel *Alox5*, *Emr1*, *Cxcl2*, *SAA3*, *Ncf1* und *Ncf2*, die repräsentativ für eine erhöhte Akkumulation von Phagozyten des Immunsystems sind (Sasmono et al., 2007). Auch Hinweise auf eine endothelial vermittelte

alterierte Gefäßmotorik werden mit der Induktion von Endothelin-1 sowie einer verminderten NO-Synthese beschrieben. Ex-vivo Studien, die die Dicke des Aortenrings zur Bestimmung von vasokonstriktorisches Reaktionen, vermittelt durch eine erhöhte Expression von Endothelin-1, nach Partikelexposition nutzten, berichteten über die besondere Empfindlichkeit dieses Organs (Künzli et al., 2005). Tierexperimentelle Studien zeigten nach der PM-Exposition neben systemischen Entzündungsreaktionen einen Anstieg der Endothelin-1 Konzentration (Vincent et al., 2001; Ulrich et al., 2002). Diese Ergebnisse weisen auf vasokonstriktorische Effekte hin und bestätigen eine durch die Partikelexposition vermittelte endotheliale Dysfunktion, die zu einem erhöhten Blutdruck führen kann (Harder et al., 2005; Pekkanen et al., 2002).

Die Studie von Sun und Mitarbeiter (2005), die ein Artherosklerose-Tiermodell für ihre PM<sub>2,5</sub>-Exposition benutzten, unterstützt die Hypothese, dass eine geänderte Endothelial-Gefäßmuskelzell-Interaktion für die gestörte Gefäßmotorik verantwortlich ist (Sun et al., 2005). In der Studie wurde gezeigt, dass mit der PM<sub>2,5</sub>-Exposition die vaskuläre Relaxation der Aorten nach Zugabe des endothel-abhängigen Agonisten Acetylcholin abgeschwächt wurde. Die Autoren diskutierten diesen Befund mit einem erhöhten Vorkommen von ROS wie z.B. Superoxid, verursacht durch entzündliche Prozesse, sowie durch eine direkte Partikel-Zell-Wechselwirkung, welche eine Herabsetzung des bio-verfügbaren NO (Stickstoff-Monoxid) zur Folge haben könnte. Dies führt zu einer verminderten Vasodilatation. In der vorliegenden Studie gab es keine Anzeichen für eine veränderte Expression von eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*), die indikativ für eine NO-Konzentrationsänderung gewesen wäre. Bedauerlicherweise war die Verfügbarkeit des Aortengewebes limitiert und beschränkte daher die Untersuchungen auf die mRNA-Expressionsanalyse. Weiterführende Studien mit ausreichendem Untersuchungsmaterial für Protein- und immunhistologische Analysen des Aortengewebes könnten Reaktionen auf Proteinebene aufzeigen und eine weitere Einsicht in die jeweiligen betroffenen Zelltypen ermöglichen, die in erster Linie auf die Partikelinhalation zu reagieren scheinen.

### 5.1.3.2 Reaktion im Herz

In den Herzgeweben zeigte sowohl die Transkript- als auch die Proteinexpressionsanalyse eine mäßige pro-entzündliche Reaktion nach 4-stündiger Partikelexposition, die mit zunehmender Expositionsdauer stärker wurde. Die Beteiligung von Monozyten und Granulozyten war durch die erhöhte Expression von Markern, wie zum Beispiel *Spp1* und *Ly6g*, und darüber hinaus durch erhöhte GM-CSF- und CXCL1-Proteinkonzentrationen zu erkennen. Die mode-

rate Konzentrationszunahme von Endothelin(*Edn1*)- und Gewebethromboplastin (*F3, tissue factor*)-Transkripten deutet auf eine mäßige vasokonstriktorische, endotheliale (Ulrich et al., 2002) und prothrombotische Reaktion auf die Partikelexposition hin (Idell et al., 2003). In der vorliegenden Studie wurde anhand der Westernblot-Analyse eine leichte Zunahme von Fibrin(ogen)deposition in den Herzkapillaren nach 24-stündiger Exposition detektiert, wobei diese Veränderungen statistisch nicht signifikant waren. Jedoch das Gesamtbild betrachtend, waren Anzeichen für eine endotheliale Dysfunktion zu beobachten, die von einer prothrombotischen Reaktion begleitet wurden. Myokardiale Erkrankungen und Veränderungen in der Genexpression von Gewebethromboplastin (*F3, tissue factor*) wurden schon nach pulmonaler Exposition mit Feinstaub, der allerdings bioverfügbares Zink enthält, oder mit einer wasserlöslichen Zinklösung berichtet (Gilmour et al., 2006, Kodavanti et al., 2002). Diese Studien deuten auf ein systemisches Ungleichgewicht im Metallhaushalt als potentielle Ursache für die nachteiligen Effekte im Herzen hin. Jedoch kann dies in der gegenwärtigen Expositionsstudie, die keine metallischen Partikel beinhaltete, ausgeschlossen werden. Wallenborn und Mitarbeiter (2007) konnten beobachten, dass hohe Dosen von intratracheal instillierten Partikeln, die von Öl-Verbrennungen herrühren, das Potential besitzen, in den Herzen von für Herzanfall anfälligen und unter spontan erhöhtem Blutdruck leidenden Ratten die Expression von durch oxidativen Stress induzierbaren Enzymen wie Superoxid Dismutase (SOD) zu erhöhen. Dies war allerdings nicht für Ratten des Wildtyps der Fall. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Studie, die mit einer viel geringeren Partikelbelastung in der Lunge generiert wurden, lassen vermuten, dass sogar Kohlenstoffpartikel von geringerer Löslichkeit aber von ultrafeiner Größe ein erhöhtes Potential für die krankheitsverursachenden Effekte in den Herzen besitzen. Das Herz und die Aorta stellen ein bemerkenswertes Beispiel für die gewebespezifische Empfindlichkeit gegenüber inhalierten UfCP dar. Obwohl sie stromabwärts der Lunge sehr eng beieinander lokalisiert sind, so dass man eine weitgehend vergleichbare Partikelexposition mit freigesetzten Mediatoren und Partikeln aus der Lunge vermuten könnte, unterschied sich das Gesamtbild der Genexpressionen innerhalb beider Organe eindeutig. Wie schon im Ergebnisteil (Seite 68, Abbildung 10) beschrieben, war *Ly6g*, ein Marker für erhöhte Akkumulation von Leukozyten im Herzgewebe, stark induziert. Vergleichbar zeigte sich der Leukozytenmarker Osteopontin (*Spp1*) zum frühen Untersuchungszeitpunkt verändert. Diese Marker waren in der Aorta nicht betroffen. Auf der anderen Seite induzierten unterschiedliche Marker, die der Endothelaktivierung zugeordnet werden, wie zum Beispiel *Edn1*, *Fga*, *Fgβ*, *Fgγ* oder *Icam1*, im Aortagewebe eine viel stärkere partikelassoziierte endotheliale Reaktion, die zum Fortschreiten einer endothelialen Dysfunktion und zudem zu entzündlichen arthe-

rosklerotischen Läsionen beitragen könnte, so wie es von anderen Wissenschaftlern schon beschrieben wurde (Künzli et al. 2005; Sun et al., 2005).

Im Zusammenhang mit der endothelial vermittelten Vasokonstriktion (durch Endothelin-1) wird auch ein Herzfrequenzanstieg sowie eine Abnahme der Herzfrequenzvariabilität mit der Partikelexposition beobachtet (Harder et al., 2005; Peters et al., 1999; Pope et al., 2004b). Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass es vor allem am erkrankten Organismus zu einer Veränderung des kardialen autonomen Gleichgewichtes kommt, möglicherweise verursacht durch pulmonale Reflexe, die sich auf eine erhöhte sympathische Aktivität auswirken. Die Studie von Bartoli und Mitarbeiter (2008) unterstützt diese Hypothese. Die experimentelle Blockade der  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren in den Lungen führte zur Unterdrückung des erhöhten systolischen und diastolischen Blutdrucks und der erhöhten Herzfrequenz von Hunden nach der Exposition von CAP (*concentrated ambient particles*). Hinsichtlich der Partikelinhalation stellt auch die Beeinflussung des sympathisch/parasympathischen Tonus des autonomen Nervensystems einen weiteren additiven Wirkungsweg dar, der zur Generierung von systemischen kardiovaskulären Negativ-Effekten führt. Gerade dieser Wirkungsweg könnte zusätzlich zu den direkten und/oder indirekten Partikeleffekten (letztere über die Freisetzung von Zytokinen/Mediatoren aus den Lungen) über das Blut zu den beobachteten komplexen systemischen Effekten im Blut sowie in den extrapulmonalen Organen beigetragen haben.

### 5.1.3.3 Reaktion in der Leber

Innerhalb der verschiedenen untersuchten sekundären Zielorgane wurde die Leber als das am stärksten betroffene Organ erwartet, da zahlreiche Studien bisher gezeigt hatten, dass Expositionen mit ultrafeinen Partikeln mit Akute-Phase-Reaktionen (Peters et al., 2005) und der Begünstigung des prokoagulativen Status assoziiert sind (Khandoga et al., 2004). Mit der Partikelexposition wird ein Konzentrationsanstieg von Akute-Phase-Proteinen wie Fibrinogen und C-reaktives Protein und von Gerinnungsfaktoren beobachtet, wobei die Leber die primäre Quelle dieser Akute-Phase-Proteine darstellt (Ruckerl et al., 2006). Darüberhinaus zeigten Karabulut und Elmas (2006), dass zirkulierende Kolloide oder Partikel von retikuloendothelialen Zellen phagozytiert werden, ein Phänomen, welches heutzutage für die verbesserte Darstellung von MR-Spektroskopie angewandt wird. Zudem ist auch bekannt, dass Kupferzellen einen Großteil der Phagozytoseleistung in der Leber abdecken. Darüberhinaus war es möglich, in Nagetier basierten, pulmonalen Expositionsstudien mit radioaktiv markierten ultrafeinen Iridium- sowie Kohlenstoffpartikeln die Translokation von ultrafeinen Partikeln in die Leber zu zeigen (Semmler et al., 2004; Oberdörster et al., 2002), allerdings nicht die

exakte zelluläre Lokalisation.

In der vorliegenden Studie spiegelte nach 4-stündiger UfCP-Exposition die Leber eine vergleichbare pro-entzündliche Reaktion wie in der Lunge wieder, in der zwar zahlreiche Proteinkonzentrationen erhöht gemessen wurden, die meisten Gene sich aber unbeeinflusst oder sogar herunterreguliert zeigten. Die Proteinkonzentrationen von allen 5 gemessenen Endothelaktivierungs-Markern sowie von Entzündungsmediatoren waren angestiegen, was im Gesamtbild für eine lokale Entzündungsreaktion in der Leber spricht. Besonders die erhöhten Proteinkonzentrationen zahlreicher Entzündungsmediatoren wie CRP, CXCL12, IFN-gamma, IL-1, IL-2, IL-12(p40), IL-13, PDGF, Resistin und TNF-alpha könnten als ein Zeichen einer lokalen Akuten-Phase-Reaktion interpretiert werden, obwohl einer der bedeutendsten Reaktanten unbeeinflusst war, nämlich IL-6. Diese pro-entzündliche Reaktion war jedoch zum Einen örtlich auf die Leber limitiert, während kein Anstieg von Akute-Phase-Proteinen in den Blutproben gemessen werden konnte, und zum Anderen zeitlich limitiert auf die frühe Phase der 4-stündigen Inhalation von UfCP, vergleichbar mit dem Reaktionsbild der Lunge. Eine mögliche Erklärung wäre, wie schon diskutiert wurde, der hormonelle Einfluss von Glucocorticoiden (5.1.2) sowie eine Beeinflussung durch das autonome Nervensystem welches den Signalweg über das Blut nicht benötigt (5.1.3.2). Zudem war weder nach 4- noch nach 24-stündiger UfCP-Inhalation eine transkriptionelle Aktivierung der untersuchten Markergene zu beobachten. Interessanterweise war zum späteren Zeitpunkt die 4-fache Menge an TGF-beta-1 Protein zu messen. Die Hochregulation dieses anti-entzündlichen und profibrotischen Zytokins war konsistent mit dem 4-fachen Anstieg der Fibronektin(*Fn1*)-Genexpression, einem wichtigen TGF-beta *target* Gen (Casini et al., 1993). Der Anstieg von extrazellulären Matrixproteinen deutet darauf hin, dass die frühe entzündliche Reaktion zu profibrotischen Reparaturmechanismen wechselte.

## **5.2 Pulmonale Effekte assoziiert mit der Infusion von UfCP (Validierung der Methoden)**

Der Vergleich der systemischen Effekte nach der Partikelinhalation und –infusion sollte Aufschlüsse über den „direkten“ (Infusion) und „indirekten“ Wirkungsweg (Inhalation) der UfCP ergeben. Voraussetzung dafür war, dass, im Vergleich zur Inhalation, bei der Infusion von UfCP keine intrapulmonale Entzündung entstehen durfte, um eine Freisetzung von Mediatoren aus der Lunge in die Blutzirkulation ausschließen zu können.



Im Vergleich zu den mit Krebs-Henseleit-Puffer exponierten Kontrollmäusen bewirkte die intraarterielle Infusion von UfCP keine Entzündungsreaktion in der Lunge. Proteinmarker, deren Expression durch die Inhalation von Partikeln beeinflusst war, zeigten keine Veränderung nach der intraarteriellen Infusion von UfCP. Endothelaktivierungsmarker-Konzentrationen von ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin waren nach der Partikelinhalation erhöht, jedoch nicht in Mäusen nach der Infusion von UfCP. Das gleiche betraf auch die Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2), ein Marker, der als Indikator für die Akkumulation von Leukozyten dient (Bartlet et al., 1995; Schwartz et al., 1998).

Ebenso für Zytokine, deren Konzentration nach der Partikelinhalation anstieg, wie zum Beispiel von TNF-alpha, IL-10, CXCL1, GM-CSF, IL-1 und IL-6, zeigte keiner von den untersuchten Entzündungsmarkern eine signifikante Veränderung nach der Partikelinfusion (Seite 70, Abbildung 11). Demnach gab es keine Hinweise für intrapulmonale Entzündungsreaktionen, die durch die intraarterielle Infusion von UfCP verursacht wurden, folglich konnte eine Freisetzung von Mediatoren ausgeschlossen werden.

### **5.3 Vergleich von systemischen Effekten: UfCP-Inhalation versus UfCP-Infusion**

**Grundprinzip:** Verglichen wurde das Gesamtbild der partikelassoziierten Effekte von den Inhalationsexperimenten mit den Veränderungen der intraarteriellen Infusion, um zwischen extrapulmonalen Reaktionen zu unterscheiden, die zum Einen durch pulmonale Entzündungsreaktionen bzw. Mediatoren und/oder zum Anderen durch über die Lunge translozierte systemisch verfügbare ultrafeine Partikel vermittelt werden könnten. Da partikelassoziierte pulmonale Veränderungen nur nach der Inhalation auftraten, wurden wie ursprünglich geplant demnach nur Effekte, die mit der Inhalation von UfCP assoziiert waren, klassifiziert und anschließend mit den Veränderungen der UfCP-Infusion verglichen. Alle anderen Effekte, die nur in der Infusion auftraten, und nicht in der Inhalation, konnten folglich nicht der pulmonalen Entzündung zugeordnet werden und wurden daher als nicht relevant für die Partikelinhalation angesehen und damit von dieser Analyse ausgeschlossen.

### **5.3.1 Herabgesetzte Plasma-Zytokinkonzentrationen und erhöhte Zellzahlen von im Blut zirkulierenden Leukozyten sind unabhängig von der Partikeltranslokation**

Ähnlich wie bei der Inhalation (5.1.2), waren nach der Partikelinfusion die Veränderungen im Blut sehr komplex und durch eine Störung des systemischen pro-/anti-entzündlichen Gleichgewichtes charakterisiert. Dies war in beiden Applikationsformen nach der Exposition von UfCP in den generell herabgesetzten Proteinkonzentrationen der Zytokine im Blut zu erkennen. Alle Zytokine, deren Konzentrationen nach der Inhalation von UfCP herabgesetzt waren, waren auch nach der Partikelinfusion reduziert, obwohl das Ausmaß der Repression um einiges stärker nach der Partikelinhalation ausfiel, vor allem nach 24-stündiger Exposition. Diese Beobachtung wurde ebenfalls durch Sepsisstudien bestätigt, wobei in diesem Zusammenhang Glucocorticoide bzw. Cortisol anti-entzündliche Effekte verursachen (Almawi et al., 2001). Zusammenfassend kann das anti-entzündliche Reaktionsbild aus dem Vergleich der Expositionsformen den direkten und indirekten Effekten zugeordnet werden und zwar primär der Partikeltranslokation, da eine gemeinsame Reduktion der Zytokinkonzentrationen zu beobachten war, und sekundär dem Effekt der verstärkt herabgesetzten Zytokinwerten, welcher der pulmonalen Entzündung zuzuordnen ist. Die direkten und indirekten Partikeleffekte sind nicht klar zu trennen, oder vielmehr beiden Mechanismen zuzuordnen.

Nach 24-stündiger UfCP-Inhalation wurden erhöhte Zellzahlen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten gemessen. Ein vergleichbares Reaktionsbild war nach der Partikelinfusion zu beobachten, welches jedoch statistisch nicht signifikant war. Interessanterweise wurde nur nach der Partikelinfusion eine moderate statistisch signifikante Lymphozytose beobachtet. Auch hier lassen sich die beobachteten Effekte der beiden Applikationsformen auf die Monozyten- und Granulozytenzellzahlen nicht eindeutig trennen. Die pulmonale Entzündung und die translozierten Partikel scheinen hier einen additiven Effekt auf die beobachtete Leukozytose auszuüben. Im Gegensatz zu diesen Befunden stellte Khandoga und Mitarbeiter (2006) nach der Partikelinfusion keine Leukozytose fest, wobei zu berücksichtigen ist, dass in deren Studie ein anderer Maustamm (Mausstamm spezifische Unterschiede in der Reaktion) und ein anderer Untersuchungszeitpunkt (2 Stunden) gewählt wurde, welches zu den unterschiedlichen Befunden beigetragen haben könnte.

### **5.3.2 Aktivierung von Blutleukozyten abhängig von der pulmonalen Entzündungsreaktion**

Die Expression der untersuchten Aktivierungsmarker auf zirkulierenden Granulozyten und Monozyten unterschied sich eindeutig zwischen den beiden Applikationsformen. Die FACS-Analyse ergab eine deutliche Reduktion der Oberflächenexpression von leukozytären Adhäsionsmolekülen wie CD54, CD18 und CD49d nach 4- und 24-stündiger Inhalation von UfCP, ähnlich wie es schon von Frampton und Mitarbeiter (2006) bei Probanden nach UfCP-Inhalation beobachtet wurde. Die Partikelinfusion hingegen zeigte keinen vergleichbaren Einfluss auf diese Marker. Vielmehr wurde eine erhöhte Expression von CD54 auf Monozyten beobachtet. Adhäsionsmoleküle wie CD18 (MAC-1-Rezeptor) und CD49d (VLA-4 Rezeptor) auf der Leukozytenoberfläche stellen die notwendigen Liganden dar, die für die Bindung an ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin und P-Selektin von Endothelzellen erforderlich sind. Diese Rezeptoren sind an leukozytären Prozessen wie dem Rollen der Leukozyten entlang des Endothels (*Rolling*) sowie der Anheftung (Adhäsion) und folglich der Wanderung von Leukozyten zwischen zwei Endothelzellen hindurch (Migration) in das entzündete Gewebe beteiligt (Laudana et al., 2006). Darüberhinaus ist die Expression sowie die Konformationsänderung von Adhäsionsmolekülen auf diesen Zellen durch die Aktivierung von Signalkaskaden induzierbar. Dafür ausschlaggebend sind interzelluläre Rezeptorkontakte zwischen Leukozyten und Endothelzellen beim vaskulären „*Rolling*“ sowie die Wirkung von freigesetzten Entzündungsmediatoren (Zytokine) (Laudanna et al., 2006). Wie schon zuvor diskutiert wurde (5.1.2), unterstützen die Ergebnisse unserer Inhalationsstudie sowie die von Frampton und Mitarbeiter (2006) die Vorstellung, dass eine Retention der aktivierten Leukozyten in den Kapillaren der Lunge stattfindet. Dieser Effekt scheint eindeutig von dem pro-entzündlichen Milieu in der Lunge abzuhängen, da die intraarterielle Infusion von UfCP keine Verminderung der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten auslöste.

### **5.3.3 Abhängigkeit der erhöhten Thrombozytenzellzahlen, deren Aktivierungszustand und der Fibrin(ogen)deposition von der pulmonalen Entzündungsreaktion**

Entgegen unseren Erwartungen aus der Studie von Khandoga und Mitarbeitern (2004) waren weder die Zellzahlen der Thrombozyten und der Riesenthrombozyten (*large platelets*) noch deren Aktivierungszustand durch die intraarterielle Partikelinfusion beeinflusst. Ebenso war

weder eine partikelassoziierte Fibrin(ogen)deposition noch eine geänderte Expression des von-Willebrand-Faktors (*Vwf*) in der Leber zu beobachten. Khandoga und Mitarbeiter (2006) zeigten eine signifikant erhöhte Thrombozytenakkumulation auf Endothelzellen der kapillaren Blutgefäße in der Leber von gesunden C57/BL6-Mäusen, die mit prothrombotischen Reaktionen, einer Fibrin(ogen)deposition und einer erhöhten Deposition des von-Willebrand-Faktors, ebenso auf der Endotheloberfläche, begleitet wurden. Eine plausible Erklärung für das unterschiedliche Reaktionsbild wäre die Tatsache, dass für die Studie von Khandoga und Mitarbeiter (2004) ein anderer Wildtyp-Mausstamm (C57/BL6 im Vergleich zu BALB/cJ) gewählt wurde und dieser hinsichtlich einer Thrombozytenaktivierung auf die Partikelinfusion systemisch sensibler reagiert. Jedoch ist dies in der Literatur nicht beschrieben. Andererseits könnte der in der vorliegenden Arbeit später gewählte Untersuchungszeitpunkt (hier 4 Stunden im Vergleich zu 2 Stunden) ein Grund für die unterschiedlich beobachteten Effekte sein.

Im Vergleich zur Partikelinfusion wurde nach der Inhalation von UfCP, hauptsächlich zum frühen Untersuchungszeitpunkt, ein signifikanter Anstieg von Thrombozytenzellzahlen und deren Aktivierungszustand beobachtet. In vergleichbarer Weise berichteten Cascio sowie Cozzi und Mitarbeiter (2007) von erhöhten Thrombozytenzellzahlen nach der intratrachealen Instillation von hohen ultrafeinen Partikeldosen (Cascio et al., 2007; Cozzi et al., 2007). Auch nach der Inhalation sowie nach der intratrachealen Instillation von DEP (*diesel exhaust particles*) wurde eine Thrombozytose sowie ein erhöhter Aktivierungszustand von Thrombozyten, der mittels einer verkürzten Blutungszeit ermittelt wurde, festgestellt (Nemmar et al., 2003). Diese Effekte waren allerdings nach der direkten systemischen DEP-Infusion von Nemmar und Mitarbeitern (2007) nicht zu beobachten. Diese Ergebnisse untermauern die Schlussfolgerung, dass die beobachteten Effekte auf die erhöhten Thrombozytenzellzahlen und deren angeregter Aktivierungszustand spezifisch für die Partikelinhalation sind. Daraus lässt sich schließen, dass die pulmonale Entzündungsreaktion auf inhalierte ultrafeine Kohlenstoffpartikel ausschlaggebend für die Aktivierung von Megakaryozyten und für die darauffolgende Freisetzung der Thrombozyten des Knochenmarks ist (Martin et al., 1983). Hinsichtlich der pulmonalen Entzündungsreaktion ist es wichtig zu erwähnen, dass inhalierte ultrafeine Partikel auch aus intrapulmonalen Megakaryozyten eine Freisetzung von Thrombozyten in das pulmonale Kapillarbett initiieren können, wie es in der Arbeit von Zucker und Mitarbeiter (2000) berichtet wurde. In der vorliegenden Studie müsste dies allerdings innerhalb von 4 Stunden, demnach vorher geschehen sein, da hauptsächlich zu diesem Zeitpunkt die zirkulierenden Thrombozytenzellzahlen und deren Aktivierungszustand erhöht waren. In einer früheren Studie des Instituts für Inhalationsbiologie am Helmholtzzentrum München waren inner-

halb einer Stunde etwa 20 % der intrapulmonal deponierten ultrafeinen  $\text{TiO}_2$ -Partikel im Lungengewebe zu detektieren (Geiser et al., 2005), wobei man damit im übertragenden Sinne auf ultrafeine Kohlenstoffpartikel eine direkte Partikel-Megakaryozyten-Wechselwirkung in Betracht ziehen kann. Die Freisetzung von Thrombozyten aus intrapulmonalen Megakaryozyten stellt für die Inhalation einen zusätzlichen und von der Aktivierung des Knochenmarks unabhängigen Wirkungsweg dar, der eine Übertragung über das Blut nicht benötigt und demnach in erster Linie die Lungenkapillaren und sekundär die Blutzirkulation davon betroffen sind.

Die Endothelzelloberfläche ist unter physiologischen Bedingungen nicht thrombogen, d.h. Thrombozyten werden nicht aktiviert und zur Adhäsion angeregt. Nach der Partikelinhalation könnte durch die schon beschriebene, Entzündungsreaktion in der Lunge sowie im Herz (Seite 68, Abbildung 10 und Seite 70, Abbildung 11) mit der Aktivierung des Endothels das physiologische Gleichgewicht zwischen pro- und anti-koagulativen Komponenten dahingehend gestört werden, dass eine Freisetzung von Gewebe-Thromboplastin (*tissue factor*, *F3*) zu einer erhöhten Thrombinkonzentration im Blut führt und diese das intravasal ubiquitär vorkommende Fibrinogen zu Fibrinprodukten spaltet. Gerade das pro-entzündliche Reaktionsbild in der Lunge mit der beobachteten Endothelzellaktivierung und mit Begleiterscheinungen einer gestörten vaskulären Zellintegrität (5.1.1) gibt Evidenz für die oben beschriebenen Mechanismen, die zu der gezeigten Fibrin(ogen)deposition sowie einer möglichen Thrombozytenadhäsion führen könnten (Idell et al., 2003). In der Veröffentlichung von Khandoga und Mitarbeiter (2002) wurde berichtet, dass die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion am Endothel auch über Fibrinogen vermittelt wird, welches an das von Endothelzellen konstitutiv exprimierte ICAM-1 bindet. Am ICAM-1 defizienten Mausmodell sowie durch die Verabreichung von anti-Fibrinogen-Antikörpern konnte in der Leber nach Reperfusion mittels Intravitalmikroskopie gezeigt werden, dass eine Blockade dieser Mechanismen in einer signifikanten Reduktion der Anzahl am Endothel permanent adhärenter Thrombozyten resultierte (Khandoga et al., 2002). Die Intravitalmikroskopie wird prinzipiell verwendet, um Reaktionen von Zellen oder Geweben auf bestimmte Reize am lebenden Organismus zu untersuchen.

Aktivierte Thrombozyten können auch nach der Endothelzellschädigung in der extrazellulären Matrix über den vWF an Kollagene adhäreren oder mittels Fibrinogen und der GlykoproteinIIb/IIa-Rezeptoren miteinander aggregieren. Es wäre denkbar, dass sich auch in der vorliegenden Studie diese Mechanismen im Rahmen der pulmonalen Entzündungsreaktion in den Lungenkapillaren ereigneten. Zudem wurden in den Lungen nach der Inhalation von UfCP erhöhte Proteinkonzentrationen des PDGF (*platelet derived growth factor*) gemessen, dessen primäre Quelle aktivierte Thrombozyten sind (Horiuchi et al., 2001; Heldin et al., 1999). Das

Gesamtbild weist auf eine erhöhte Akkumulation von aktivierten Thrombozyten in den Lungengefäßen hin, die mit der dort zeitgleich detektierten Fibrin(ogen)deposition in Zusammenhang gebracht werden kann.

### **5.3.4 Additivwirkung pulmonaler Entzündung und zirkulierender UfCP auf die Aorta**

Beide Applikationsformen resultierten eindeutig in einer entzündlichen und prothrombotischen Veränderung in der Aorta, wohingegen im Vergleich zur UfCP-Inhalation die auf die Partikelinfusion folgenden Reaktionen schwächer ausfielen (Seite 68, Abbildung 10). Das schwächer ausgefallene Reaktionsmuster nach der Infusion von UfCP erfolgte trotz der Tatsache, dass die intraarterielle systemische Partikelbelastungsspitze nach der Infusion von UfCP eigentlich größer ist im Vergleich zur Inhalation von UfCP (nach dem erfolgten Inhalationsweg). Bei der Infusion wird die Partikeldosis bekanntermaßen innerhalb von Minuten verabreicht, wohingegen bei der Inhalation von UfCP die Partikeldosis innerhalb von 24 Stunden in der Blutzirkulation akkumuliert. Folglich hätte man im Grunde nach der Infusion von UfCP stärkere Veränderungen im Vergleich zur Inhalation erwartet. Die Reaktionsmuster der Genexpressionen von Partikelinhalation und -infusion überlappten für *Cxcl5* (Entzündungsmediator) und *Vcam1* (Endothelaktivierung). Beide Gene sind bekannt dafür, nicht durch akkumulierte Leukozyten sondern vielmehr durch entzündliche Stimuli (Zytokine) in aktivierten Endothelzellen hochreguliert zu sein (Imaizumi et al., 1997; Iiyama et al., 1999). Das Gen *Cxcl5* codiert für ein Chemokin, welches von Endothelzellen freigesetzt wird und zur Aktivierung und zur Rekrutierung von Leukozyten beiträgt. Das Gen *Vcam1* codiert für das Adhäsionsmolekül VCAM-1, welches bei Infiltrationsvorgängen für die feste Adhäsion von Leukozyten am Endothel beiträgt. Bei einer Endothelaktivierung wird dieses Protein auf der Zelloberfläche von Endothelzellen erhöht exprimiert (Laudana et al., 2006). In der vorliegenden Studie waren andere Markergene, die mit einer Endothelaktivierung assoziiert werden (wie *Edn1*, *Fga*, *Fgg*, *Icam1* und *Selp*), sowie Gene, die für die Akkumulation von Monozyten indikativ sind (wie *Alox5*, *Emr1*, *Cd68*, *Lcn2*, *Spp1* und *Saa3*), nur nach der Inhalation von UfCP induziert. Damit zeigt sich für die Partikelinhalation ein verstärktes proentzündliches Reaktionsmuster. Auch mit der über 10-fachen Induktion von Endothelin-1 Transkripten (Endothelaktivierungsmarker) werden, im Gegensatz zur Partikelinfusion, vaso-konstriktorische Effekte in Verbindung gebracht. Diese Effekte wurden bereits in zahlreichen Studien nach Partikelexpositionen gezeigt (Seite 102f, Kapitel 5.1.3.1).

Andererseits konnte nach der Partikelinfusion nur für Osteopontin (*Spp1*) eine Induktion beobachtet werden, von dem bekannt ist, dass es an Stellen von artherosklerotischen Läsionen überexprimiert wird (Liou et al., 2005). Auch moderate Induktionen für oxidative Stressmarker wie *Gclc* und *Hmox1*, die mit einer direkten Partikel-Zellinteraktion, der Bildung von ROS und damit mit oxidativen Stress assoziiert werden, waren nur nach der UfCP-Infusion zu beobachten. Die Gamma-Glutamyl-Synthetase ist bei der Glutathionsynthese das geschwindigkeitsbestimmende Enzym. Kommt es bei oxidativem Stress zu einer Verschiebung des GSH/GSSG-Redoxgleichgewichtes zu Ungunsten von GSH (Glutathion), wird die Synthese dieses Enzyms induziert (Rahman et al., 2005). Daher ist dies auf Transkriptioneller Ebene ein Marker für oxidativen Stress. Eine erhöhte Expression der Hämoxigenase-1 (*Hmox1*) in den Zellen erfolgt meist bei zellulärem oxidativen Stress sowie durch pro-entzündliche Zytokine (Siow et al., 1999). Frei verfügbares Häm (ein Prooxidant) wird mittels der Hämoxigenase-1 zu Biliverdin und CO umgesetzt. Nachfolgend wird Biliverdin zu Bilirubin, welches als Antioxidant wirkt, katalysiert. Auch eine herabgesetzte NO-Konzentration, verursacht durch zellulären oxidativen Stress, die eine gestörte Gefäßmotorik (Vasokonstriktion) zur Folge haben kann, wird durch die Generierung von CO, ein alternativ wirkender Vasodilator, und mittels der Hämoxigenase-1 kompensiert (Siow et al., 1999). Auch der Induktion der Hämoxigenase-1 wird eine antiapoptotische Wirkung zugewiesen (Siow et al., 1999). Letztlich weisen die Ergebnisse der UfCP-Infusion darauf hin, dass es durch die direkt systemisch verfügbaren Partikel zu oxidativem Stress und der Induktion von pro-entzündlichen Markern (*Cxcl5*, *Vcam1*) im Rahmen einer Endothelaktivierung kommt (Imaizumi et al., 1997; Iiyama et al., 1999). Gerade diese Vorgänge begünstigen eine Rekrutierung und Infiltration von Leukozyten in das geschädigte Gewebe (Laudana et al., 2006). Dennoch weisen die Effekte, die durch beide UfCP-Applikationsformen in der Aorta induziert wurden, auf einen additiven Einfluss der systemisch verfügbaren Partikel und der pulmonalen Entzündung hin, wobei der pulmonalen Entzündung hinsichtlich dem Reaktionsbild der Endothelaktivierung und der Akkumulation von Leukozyten eine deutlich größere Bedeutung zuzuordnen ist.

### **5.3.5 Pulmonale Entzündung als Auslöser der Effekte im Herz und in der Leber**

#### **5.3.5.1 Reaktion im Herz**

Das pro-entzündliche Reaktionsmuster, wie es nach der UfCP-Inhalation anhand der Gen- sowie der Proteinexpressionsanalyse zu sehen war, wurde in den infusionsexponierten Tieren

nicht beobachtet. Auf Proteinebene waren, abgesehen von TGF-beta-1, der sich 1,5-fach reprimiert zeigte, keine der untersuchten Entzündungsmarker durch die UfCP-Infusion signifikant verändert. Es lässt sich daraus schließen, dass die pulmonale Entzündungsreaktion, die durch die Inhalation von UfCP verursacht wird, den hauptsächlichen Beitrag zu den partikelassoziierten kardialen Effekten leistet.

Hinsichtlich der konträren Zytokinkonzentrationen im Plasma bleiben die auslösenden Wirkungswege, die die kardialen Effekte vermitteln, noch unbekannt und erfordern weitere Untersuchungen. Ein möglicher Aktionsweg könnte die Aktivierung von Leukozyten im vaskulären Gefäßbett der Partikel-exponierten Lungen sein. Diese aktivierten Leukozyten könnten wiederum durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) weitere Leukozyten in der Blutzirkulation aktivieren, die dann ein erhöhtes vaskuläres *Rolling*, eine Anheftung der Leukozyten an das Endothel und eine Migration in das Gewebe der sekundären Zielorgane wie zum Beispiel dem Herz, der Aorta und der Leber zur Folge haben könnten. Dieser Aktionsweg böte eine mögliche Erklärung für die damit assoziierbaren, lokal erhöhten Zytokinkonzentrationen in den untersuchten Organen, wie zum Beispiel dem Herz. Ähnliche Hinweise dafür wurden schon von Nurkiewicz und Mitarbeiter (2006) gefunden, die nach ROFA- und TiO<sub>2</sub>-Expositionen von Ratten mittels intravitaler Mikroskopie des *spinotrapezius* Muskels ohne Anzeichen für eine systemische Entzündung ein erhöhtes Leukozytenrollen und Adhäsionen von Granulozyten detektieren konnten.

Ein Effekt, der ausschließlich nach der Partikelinfusion beobachtet werden konnte, war die moderate Induktion von Genen, die mit oxidativen Stressreaktionen assoziiert werden, im Herz- und Aortagewebe. Derartige Effekte wurden nach der Inhalation von UfCP nicht beobachtet. Eine mögliche Erklärung wäre die intraarterielle systemische Partikelbelastungsspitze, die bei der Infusion größer als im Vergleich zu der Inhalation ist, da die Aufnahme der vergleichbaren Partikelmasse bei der Inhalation akkumulierend über den Zeitraum von 24 Stunden erfolgt. Wallenborn und Mitarbeiter (2007) berichteten jedoch über induzierte Marker für oxidativen Stress und eine Entzündungsreaktion in der Lunge nach intratrachealer Instillation hoher Feinstaubdosen. Dieser Befund zeigt, dass der indirekte Mechanismus (aufgrund der Lungenentzündung), der zum oxidativen Stress im Herz führt, generell nicht ausgeschlossen werden kann.

### 5.3.5.2. Reaktion in der Leber

Die inhalierten Partikel induzierten eine kurzlebige Reaktion in der Leber, die größtenteils in erhöhten Proteinkonzentrationen von Entzündungsmediatoren, von Endothelaktivierungsmar-



kern und von weiteren Proteinen, die indikativ für die Akkumulation von Leukozyten stehen, zu beobachten war (Seite 70, Abbildung 11). Interessanterweise ergaben die Proteinexpressionsanalysen der Lunge und der Leber zum frühen Untersuchungszeitpunkt ein vergleichbares pro-entzündliches Reaktionsbild, wobei das der Lunge stärker ausfiel. Da bei der intraarteriellen Infusion keiner dieser Entzündungsmarker verändert war, konnte daraus gefolgert werden, dass die entzündlichen Veränderungen in der Lunge für die entzündliche Reaktion in der Leber erforderlich sind und die Partikeltranslokation dafür keine ausschlaggebende Rolle spielt. Die Hypothese, dass eine pulmonal vermittelte systemische Akute-Phase-Reaktion in der Leber einen vorangegangenen Anstieg von Zytokinen im Blut erfordert, konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Dies könnte daran liegen, dass entweder die für die systemischen Effekte in der Leber erforderlichen Mediatoren nicht in dem Untersuchungskit der Plasma-Marker enthalten waren. Auch der Zeitpunkt der Messung könnte zu spät gewählt worden sein, wenn man davon ausgeht, dass einerseits die untersuchten Parameter zum frühen Untersuchungszeitpunkt nur noch auf Proteinebene induziert gemessen werden konnten. Andererseits zum gleichen Zeitpunkt aber auf Genexpressionsebene schon ein anti-entzündliches Reaktionsmuster zu erkennen war, welches ebenso nach 24-stündiger Inhalation von UfCP anhand der mRNA- und Proteinkonzentrationen zu beobachten war (5.1.3.3). Der schon angesprochene mögliche anti-entzündliche Einfluss von Glucocorticoiden auf die Zytokinkonzentrationen im Blut könnte auch hier in der Leber neben den fibrotischen Mechanismen additiv zu dem beobachteten anti-entzündlichen Reaktionsmuster führen (Prigent et al., 2004).

Die erhöhte signifikante Deposition von Fibrin(ogen) auf Endothelzellen von kapillaren Blutgefäßen in der Leber, wie es Khandoga und Mitarbeiter (2004) 2 Stunden nach der Infusion von UfCP in C57BL/6J-Mäusen berichteten, konnte in der vorliegenden Studie weder nach der Inhalation noch nach der intraarteriellen Infusion bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Befunde kann der später gewählte Untersuchungszeitpunkt, d.h. 4 im Vergleich zu 2 Stunden nach der Partikelexposition sein. Darüberhinaus ist auch bekannt, dass es Mausstamm spezifische Unterschiede in ihrer entzündlichen Reaktionsweise gibt, die eine Ursache für die unterschiedlichen Befunde sind (C57BL/6J- versus BALB/cJ-Mäuse).

## Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten die Hypothesen der epidemiologischen und toxikologischen Studien bestätigen, dass die Entzündungsreaktion in der Lunge notwendig für

die meisten partikelassoziierten extrapulmonalen Effekte ist. So verursachen die von der Lunge in die Blutzirkulation translozierten UfCP, welche innerhalb der Applikationsformen durch die intraarterielle Infusion simuliert wurden, keine oder gegebenenfalls nur geringfügige Veränderungen auf die untersuchten entzündungsrelevanten Endpunkte in den extrapulmonalen Zielorganen. Damit kann die Hypothese, dass die translozierten Partikel durch ihre direkte Wechselwirkung (Khandoga et al., 2004) bzw. Penetration in die Blutzirkulation (Nemmar et al., 2002a; 2003b) prothrombotische Effekte auslösen könnten, nicht bestätigt werden. Darüberhinaus ist nur nach der Inhalation von UfCP in den untersuchten extrapulmonalen Organen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein lokales pro-entzündliches Reaktionsmuster zu erkennen, welches potentiell zur Progression kardiovaskulärer Erkrankungen führen kann (Peters et al., 2005). Ebenso kann die Hypothese der erhöhten Freisetzung von löslichen Mediatoren ins Blut als grundlegenden Wirkungsweg für extrapulmonale Effekte im Organismus in der vorliegenden Arbeit mit den gegebenen Mitteln nicht bestätigt werden. Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse und ihre Interpretation zeigen die Komplexität der Reaktionsweise des Gesamtsystems auf und weisen aufgrund der Lungenentzündung auf eine Modulation des vegetativen Nervensystems, welches einen additiven Einfluss auf die beobachteten kardiovaskulären Effekte haben könnte und in zukünftigen Studien weiter untersucht werden muss. Eindeutig kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit die wichtigste Aussage gemacht werden, dass die Lungenentzündung und nicht die Translokation ultrafeiner Partikel entscheidend für die extrapulmonalen Effekte ist.

## 6 Zusammenfassung

Die Exposition mit Umweltstäuben, ultrafeinen Partikeln und Gasen wird als Ursache akuter kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität angesehen. Epidemiologische und toxikologische Studien der letzten Jahre weisen auf die Bedeutung von ultrafeinen Partikeln als Auslöser für die lokalen pulmonalen und systemischen Entzündungsreaktionen hin, die durch Veränderungen in der kardiovaskulären Funktion gekennzeichnet sind. Dazu gehören endotheliale Dysfunktion und prothrombotische Prozesse, die letztlich zum akuten Herztod führen können. Die Mechanismen, die dazu führen, sind derzeit nur unzureichend geklärt. Es konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass ultrafeine Partikel von der Lunge in die systemische Blutzirkulation translozieren können. Als Ursache kardiovaskulärer Negativ-Effekte werden entweder die Freisetzung von löslichen Mediatoren aus der Lunge und direkte Effekte von translozierten, ultrafeinen Partikeln in die systemische Blutzirkulation diskutiert.

Unsere Tierexpositionsstudie wurde durchgeführt, um die Hypothesen zu prüfen, dass „translozierte“ ultrafeine Kohlenstoffpartikel (UfCP) eine signifikante extrapulmonale Entzündung induzieren können. Zu diesem Zweck wurden die systemischen Effekte von zwei verschiedenen Expositionsmodellen verglichen. Die Versuchsmäuse wurden mittels der Inhalation von UfCP (48 nm; 440  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) bzw. gefilterter Luft für 4 oder 24 Stunden oder durch die intraarterielle Infusion mit der berechneten äquivalenten Dosis von innerhalb einer 24-Stunden-Inhalation translozierten UfCP ( $5 \times 10^7$  UfCP) exponiert. Die Versuchsmäuse wurden hinsichtlich systemischer Effekte in der Blutzirkulation mittels automatisierter hämatologischer Untersuchung von Zellzahlen und Plasma-Zytokin-Konzentrationen untersucht. Darüber hinaus wurden Aktivierungsmarker auf peripheren Monozyten und Granulozyten mit FACS analysiert. Zur Untersuchung der lokalen, entzündlichen, mikrovaskulären Effekte in den Geweben von der Lunge, vom Herz, von der Aorta und von der Leber wurde eine quantitative Genexpressionsanalyse und eine multianalytische Proteinexpressionsanalyse durchgeführt.

Die Inhalation von UfCP war durch eine leichte pulmonale Entzündungsreaktion mit endothelialer Aktivierung und einer leicht erhöhten Fibrin(ogen)deposition auf Endothelzellen von kapillaren Blutgefäßen der Lunge gekennzeichnet, wohingegen die intraarterielle Infusion von UfCP keine signifikanten Reaktionen in der Lunge aufwies. Auf systemischer Ebene verursachten beide Expositionsmodelle nach der Partikelexposition einen Anstieg von neutrophilen Granulozyten- und Monozytenzellzahlen und zugleich eine Abnahme der pro-entzündlichen Plasma-Zytokin-Konzentrationen, jedoch mit einem stärkeren Effekt nach der Inhalation von UfCP.

Hinsichtlich dieser Endpunkte lassen diese Ergebnisse auf einen adjuvanten Effekt von „translozierten“ Partikeln schließen. Jedoch zeigte sich nur nach der Inhalation von UfCP eine signifikante Abnahme von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche der zirkulierenden Leukozyten-Populationen, was auf eine Retention/Transmigration von aktivierten Zellen über die Adhäsion des aktivierten Endothels in der Lunge hinweist. Das Zytogramm der Thrombozyten ergab ebenso nur nach der Inhalation von UfCP einen Anstieg der Zellzahlen und ihres Aktivierungszustandes und dessen der Riesenthrombozyten. Diese Tatsache lässt auf die notwendige pulmonale Entzündungsreaktion schließen, die für die Rekrutierung und Aktivierung der Thrombozyten ausschlaggebend war. In beiden Expositionsmodellen mit UfCP zeigte innerhalb der extrapulmonalen Organe die Aorta die stärkste entzündliche und prothrombotische Reaktion auf, wobei im Vergleich zur intraarteriellen Exposition ein stärkeres pro-entzündliches Reaktionsbild nach der Inhalation von UfCP zu erkennen war. Die Inhalation von UfCP induzierte in der Leber eine frühe, vorübergehende pro-entzündliche Reaktion mit einer endothelialen Aktivierung und einer geringfügigen Reaktion im Herzen, die mit steigender Expositionsdauer zunahm, während die intraarterielle Infusion von UfCP in diesen Organen keine offensichtlichen Effekte verursachte.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass die systemisch verfügbaren UfCP teilweise förderliche Effekte auf spezifische biologische Endpunkte haben mögen. Jedoch zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass die Entzündungsreaktion in der Lunge entscheidender für die meisten extrapulmonal beobachteten Effekte ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kann die wichtigste Aussage getroffen werden, dass die Lungenentzündung und nicht die Translokation ultrafeiner Partikel entscheidend für die extrapulmonalen Effekte ist.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahnadi, C.E., Sabrinah Chapman, E., Lepine, M., Okrongly, D., Pujol-Moix, N., Hernandez, A., Boughrassa, F., and Grant, A.M.** (2003). Assessment of platelet activation in several different anticoagulants by the Advia 120 Hematology System, fluorescence flow cytometry, and electron microscopy. *Thromb Haemost* 90, 940-948.
- Alessandrini, F., Schulz, H., Takenaka, S., Lentner, B., Karg, E., Behrendt, H., and Jakob, T.** (2006). Effects of ultrafine carbon particle inhalation on allergic inflammation of the lung. *J Allergy Clin Immunol* 117, 824-830.
- Alessandrini, F., Semmler-Behnke, M., Jakob, T., Schulz, H., Behrendt, H., and Kreyling, W.** (2008). Total and regional deposition of ultrafine particles in a mouse model of allergic inflammation of the lung. *Inhal Toxicol* 20, 585-593.
- Almawi, W.Y., and Melemedjian, O.K.** (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J Leukoc Biol* 71, 9-15.
- Andre, E., Stoeger, T., Takenaka, S., Bahnweg, M., Ritter, B., Karg, E., Lentner, B., Reinhard, C., Schulz, H., and Wjst, M.** (2006). Inhalation of ultrafine carbon particles triggers biphasic pro-inflammatory response in the mouse lung. *Eur Respir J* 28, 275-285.
- Andreotti, F., Burzotta, F., and Maseri, A.** (1999). Fibrinogen as a marker of inflammation: a clinical view. *Blood Coagul Fibrinolysis* 10 Suppl 1, S3-4.
- Bartlett, M.R., Underwood, P.A., and Parish, C.R.** (1995). Comparative analysis of the ability of leucocytes, endothelial cells and platelets to degrade the subendothelial basement membrane: evidence for cytokine dependence and detection of a novel sulfatase. *Immunol Cell Biol* 73, 113-124.
- Bartoli, C.R., Wellenius, G.A., Diaz, E.A., Lawrence, J., Coull, B.A., Akiyama, I., Lee, L.M., Okabe, K., Verrier, R.L., Godleski, J.J.** (2008). Mechanisms of inhaled fine particulate air pollution – induced arterial blood pressure changes. *Environ Health Persp* 11573.
- Baumgarth, N., and Roederer, M.** (2000). A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* 243, 77-97.
- Beck-Speier, I., Dayal, N., Karg, E., Maier, K.L., Schumann, G., Schulz, H., Semmler, M., Takenaka, S., Stettmaier, K., Bors, W., et al.** (2005). Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles. *Free Radic Biol Med* 38, 1080-1092.
- Borm, P.J., and Kreyling, W.** (2004). Toxicological hazards of inhaled nanoparticles--potential implications for drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol* 4, 521-531.
- Brauer, M., Ebelt, S.T., Fisher, T.V., Brumm, J., Petkau, A.J., and Vedal, S.** (2001). Exposure of chronic obstructive pulmonary disease patients to particles: respiratory and cardiovascular health effects. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 11, 490-500.

- Brauer, M., Ebel, S.T., Fisher, T.V., Brumm, J., Petkau, A.J., and Vedal, S.** (2001). Exposure of chronic obstructive pulmonary disease patients to particles: respiratory and cardiovascular health effects. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 11, 490-500.
- Brook, R.D., Brook, J.R., Urch, B., Vincent, R., Rajagopalan, S., and Silverman, F.** (2002). Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. *Circulation* 105, 1534-1536.
- Brook, R.D., Franklin, B., Cascio, W., Hong, Y., Howard, G., Lipsett, M., Luepker, R., Mittleman, M., Samet, J., Smith, S.C., Jr., et al.** (2004). Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation* 109, 2655-2671.
- Brown, D.M., Wilson, M.R., MacNee, W., Stone, V., and Donaldson, K.** (2001). Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* 175, 191-199.
- Campen, M.J., Nolan, J.P., Schladweiler, M.C., Kodavanti, U.P., Costa, D.L., and Watkinson, W.P.** (2002). Cardiac and thermoregulatory effects of instilled particulate matter-associated transition metals in healthy and cardiopulmonary-compromised rats. *J Toxicol Environ Health A* 65, 1615-1631.
- Cascio, W.E., Cozzi, E., Hazarika, S., Devlin, R.B., Henriksen, R.A., Lust, R.M., Van Scott, M.R., and Wingard, C.J.** (2007). Cardiac and vascular changes in mice after exposure to ultrafine particulate matter. *Inhal Toxicol* 19 Suppl 1, 67-73.
- Casini, A., Pinzani, M., Milani, S., Grappone, C., Galli, G., Jezequel, A.M., Schuppan, D., Rotella, C.M., and Surrenti, C.** (1993). Regulation of extracellular matrix synthesis by transforming growth factor beta 1 in human fat-storing cells. *Gastroenterology* 105, 245-253.
- Chalupa, D.C., Morrow, P.E., Oberdorster, G., Utell, M.J., and Frampton, M.W.** (2004). Ultrafine particle deposition in subjects with asthma. *Environ Health Persp* 112, 879-882.
- Chang, C.C., Chiu, H.F., Wu, Y.S., Li, Y.C., Tsai, M.L., Shen, C.K., and Yang, C.Y.** (2005). The induction of vascular endothelial growth factor by ultrafine carbon black contributes to the increase of alveolar-capillary permeability. *Environ Health Perspect* 113, 454-460.
- Chen, L.H., Knutsen, S.F., Shavlik, D., Beeson, W.L., Petersen, F., Ghamsary, M., and Abbey, D.** (2005). The association between fatal coronary heart disease and ambient particulate air pollution: Are females at greater risk? *Environ Health Perspect* 113, 1723-1729.
- Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., et al.** (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91, 3527-3561.
- Cozzi, E., Wingard, C.J., Cascio, W.E., Devlin, R.B., Miles, J.J., Boffending, A.R., Lust, R.M., Van Scott, M.R., and Henriksen, R.A.** (2007). Effect of ambient particulate matter exposure on hemostasis. *Transl Res* 149, 324-332.

**Daigle, C.C., Chalupa, D.C., Gibb, F.R., Morrow, P.E., Oberdorster, G., Utell, M.J., and Frampton, M.W.** (2003). Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhal Toxicol* 15, 539-552.

**Danesh, J., Whincup, P., Walker, M., Lennon, L., Thomson, A., Appleby, P., Gallimore, J.R., and Pepys, M.B.** (2000). Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ* 321, 199-204.

**Delfino, R.J., Sioutas, C., and Malik, S.** (2005). Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect* 113, 934-946.

**Devlin, R.B., Ghio, A.J., Kehrl, H., Sanders, G., and Cascio, W.** (2003). Elderly humans exposed to concentrated air pollution particles have decreased heart rate variability. *Eur Respir J Suppl* 40, 76s-80s.

**Dobbins, R.A., Mulholland, G.W., and Bryner, N.P.** (1994). Comparison of a fractal smoke optics model with light extinction measurements. *Atmospheric Environment* 28, 889-897.

**Dockery, D.W., Pope, C.A., 3rd, Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G., Jr., and Speizer, F.E.** (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* 329, 1753-1759.

**Dockery, D.W., Speizer, F.E., Stram, D.O., Ware, J.H., Spengler, J.D., and Ferris, B.G., Jr.** (1989). Effects of inhalable particles on respiratory health of children. *Amer Rev Respir Dis* 139 (3), 587 - 594.

**Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C., and Healy, J.I.** (1997). Differential activation of transcription factors induced by  $\text{Ca}^{2+}$  response amplitude and duration. *Nature* 386, 855-858.

**Donaldson, K., and Stone, V.** (2003). Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita* 39, 405-410.

**Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L.A., Duffin, R., Newby, D.E., Mills, N., MacNee, W., and Stone, V.** (2005). Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol* 2, 10.

**Elangbam, C.S., Qualls, C.W., Jr., and Dahlgren, R.R.** (1997). Cell adhesion molecules--update. *Vet Pathol* 34, 61-73.

**Elder, A., N. Corson, R. Gelein, P. Mercer, A. Rinderknecht, J. Finkelstein, G. Oberdorster** (2007). Tissue distribution in rats of surface-modified quantum dots following lung or intravenous exposure. *Am J Res Crit Care Med* 175, A246.

**Elder, A., Gelein, R., Finkelstein, J.N., Driscoll, K.E., Harkema, J., and Oberdorster, G.** (2005). Effects of Subchronically Inhaled Carbon Black in Three Species. I. Retention Kinetics, Lung Inflammation, and Histopathology. *Toxicol Sci* 88, 614-629.

**Elder, A., and Oberdorster, G.** (2006). Translocation and effects of ultrafine particles outside of the lung. *Clin Occup Environ Med* 5, 785-796.

- Elder, A.C., Gelein, R., Azadniv, M., Frampton, M., Finkelstein, J., and Oberdorster, G.** (2004). Systemic effects of inhaled ultrafine particles in two compromised, aged rat strains. *Inhal Toxicol* 16, 461-471.
- Elisaf, M.** (2001). The treatment of coronary heart disease: an update. Part 1: An overview of the risk factors for cardiovascular disease. *Curr Med Res Opin* 17, 18-26.
- Esterbauer, H., Schaur, R.J., and Zollner, H.** (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11, 81-128.
- Forman, H.J., Fukuto, J.M., and Torres, M.** (2004). Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C246-256.
- Frampton, M.W., Stewart, J.C., Oberdorster, G., Morrow, P.E., Chalupa, D., Pietropaoli, A.P., Frasier, L.M., Speers, D.M., Cox, C., Huang, L.S., et al.** (2006). Inhalation of ultrafine particles alters blood leukocyte expression of adhesion molecules in humans. *Environ Health Persp* 114, 51-58.
- Frampton, M.W., Utell, M.J., Zareba, W., Oberdorster, G., Cox, C., Huang, L.S., Morrow, P.E., Lee, F.E., Chalupa, D., Frasier, L.M., et al.** (2004). Effects of exposure to ultrafine carbon particles in healthy subjects and subjects with asthma. *Res Rep Health Eff Inst*, 1-47; discussion 49-63.
- Galley, H.F., and Webster, N.R.** (2004). Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* 93, 105-113.
- Gauderman, W.J., Avol, E., Gilliland, F., Vora, H., Thomas, D., Berhane, K., McConnell, R., Kuenzli, N., Lurmann, F., Rappaport, E., et al.** (2004). The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *N Engl J Med* 351, 1057-1067.
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im Hof, V., Heyder, J., and Gehr, P.** (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Persp* 113, 1555-1560.
- Gerde, P., Muggenburg, B.A., Lundborg, M., and Dahl, A.R.** (2001). The rapid alveolar absorption of diesel soot-adsorbed benzo[a]pyrene: bioavailability, metabolism and dosimetry of an inhaled particle-borne carcinogen. *Carcinogenesis* 22, 741-749.
- Gilmour, P.S., Morrison, E.R., Vickers, M.A., Ford, I., Ludlam, C.A., Greaves, M., Donaldson, K., and MacNee, W.** (2005). The procoagulant potential of environmental particles (PM<sub>10</sub>). *Occup Environ Med* 62, 164-171.
- Gilmour, P.S., Nyska, A., Schladweiler, M.C., McGee, J.K., Wallenborn, J.G., Richards, J.H., and Kodavanti, U.P.** (2006). Cardiovascular and blood coagulative effects of pulmonary zinc exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 211, 41-52.
- Gold, D.R., Litonjua, A., Schwartz, J., Lovett, E., Larson, A., Nearing, B., Allen, G., Verrier, M., Cherry, R., and Verrier, R.** (2000). Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation* 101, 1267-1273.



- Goldberg, M.S., Burnett, R.T., Bailer, J.C., 3rd, Tamblyn, R., Ernst, P., Flegel, K., Brook, J., Bonvalot, Y., Singh, R., Valois, M.F., et al.** (2001). Identification of persons with cardiorespiratory conditions who are at risk of dying from the acute effects of ambient air particles. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 4, 487-494.
- Graff, D.W., Cascio, W.E., Brackhan, J.A., and Devlin, R.B.** (2004). Metal particulate matter components affect gene expression and beat frequency of neonatal rat ventricular myocytes. *Environ Health Perspect* 112, 792-798.
- Grandaliano, G., Gesualdo, L., Ranieri, E., Monno, R., Stallone, G., and Schena, F.P.** (1997). Monocyte chemotactic peptide-1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection. *Transplantation* 63, 414-420.
- Guilbert, J.J.** (2003). The world health report 2002 - reducing risks, promoting healthy life. *Educ Health (Abingdon)* 16, 230.
- Gwaze, P., Schmid, O., Annegarn, H.J., Andreae, M.O., Huth, J., and Helas, G.** (2006). Comparison of three methods of fractal analysis applied to soot aggregates from wood combustion. *J Aerosol Sci* 37, 820-838.
- Haidaris, P.J.** (1997). Induction of fibrinogen biosynthesis and secretion from cultured pulmonary epithelial cells. *Blood* 89, 873-882.
- Harder, V., Gilmour, P., Lentner, B., Karg, E., Takenaka, S., Ziesenis, A., Stampfl, A., Kodavanti, U., Heyder, J., and Schulz, H.** (2005). Cardiovascular responses in unrestrained WKY rats to inhaled ultrafine carbon particles. *Inhal Toxicol* 17, 29-42.
- Heldin, C.H., and Westermark, B.** (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79, 1283-1316.
- Horiuchi, H., Inoue, T., Furusawa, S., and Matsuda, H.** (2001). Characterization and expression of three forms of cDNA encoding chicken platelet-derived growth factor-A chain. *Gene* 272, 181-190.
- Huang, Y.C., Ghio, A.J., Stonehuerner, J., McGee, J., Carter, J.D., Grambow, S.C., and Devlin, R.B.** (2003). The role of soluble components in ambient fine particles-induced changes in human lungs and blood. *Inhal Toxicol* 15, 327-342.
- Ibald-Mulli, A., Stieber, J., Wichmann, H.E., Koenig, W., and Peters, A.** (2001). Effects of air pollution on blood pressure: a population-based approach. *Am J Public Health* 91, 571-577.
- Ibald-Mulli, A., Timonen, K.L., Peters, A., Heinrich, J., Wolke, G., Lanki, T., Buzorius, G., Kreyling, W.G., de Hartog, J., Hoek, G., et al.** (2004). Effects of particulate air pollution on blood pressure and heart rate in subjects with cardiovascular disease: a multicenter approach. *Environ Health Perspect* 112, 369-377.
- Idell, S.** (1994). Extravascular coagulation and fibrin deposition in acute lung injury. *New Horiz* 2, 566-574.

- Idell, S.** (2003). Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit Care Med* 31, S213-220.
- Iiyama, K., Hajra, L., Iiyama, M., Li, H., DiChiara, M., Medoff, B.D., and Cybulsky, M.I.** (1999). Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* 85, 199-207.
- Imaizumi, T., Albertine, K.H., Jicha, D.L., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., and Zimmerman, G.A.** (1997). Human endothelial cells synthesize ENA-78: relationship to IL-8 and to signaling of PMN adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 181-192.
- Jang, Y., Lincoff, A.M., Plow, E.F., and Topol, E.J.** (1994). Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 24, 1591-1601.
- Jedrychowski, W., Flak, E., and Mroz, E.** (1999). The adverse effect of low levels of ambient air pollutants on lung function growth in preadolescent children. *Environ Health Perspect* 107, 669-674.
- Jimenez, L.A., Thompson, J., Brown, D.A., Rahman, I., Antonicelli, F., Duffin, R., Drost, E.M., Hay, R.T., Donaldson, K., and MacNee, W.** (2000). Activation of NF-kappaB by PM(10) occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of IkappaB degradation. *Toxicol Appl Pharmacol* 166, 101-110.
- Karabulut, N., and Elmas, N.** (2006). Contrast agents used in MR imaging of the liver. *Diagn Interv Radiol* 12, 22-30.
- Khandoga, A., Biberthaler, P., Enders, G., Axmann, S., Hutter, J., Messmer, K., and Krombach, F.** (2002). Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo. *Transplantation* 74, 681-688.
- Khandoga, A., Stampfl, A., Takenaka, S., Schulz, H., Radykewicz, R., Kreyling, W., and Krombach, F.** (2004). Ultrafine particles exert prothrombotic but not inflammatory effects on the hepatic microcirculation in healthy mice in vivo. *Circulation* 109, 1320-1325.
- Kilpatrick, D.C.** (2002). Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. *Transfus Med* 12, 335-352.
- Kodavanti, U.P., Moyer, C.F., Ledbetter, A.D., Schladweiler, M.C., Costa, D.L., Hauser, R., Christiani, D.C., and Nyska, A.** (2003). Inhaled environmental combustion particles cause myocardial injury in the Wistar Kyoto rat. *Toxicol Sci* 71, 237-245.
- Kodavanti, U.P., Schladweiler, M.C., Ledbetter, A.D., Hauser, R., Christiani, D.C., McGee, J., Richards, J.R., and Costa, D.L.** (2002). Temporal association between pulmonary and systemic effects of particulate matter in healthy and cardiovascular compromised rats. *J Toxicol Environ Health A* 65, 1545-1569.
- Korn, R.J., Dockery, D.W., Speizer, F.E., Ware, J.H., and Ferris, B.G., Jr.** (1987). Occupational exposures and chronic respiratory symptoms. A population-based study. *Amer Rev Respir Dis* 136 (2), 298 - 304.

- Kreyling, W.G., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schulz, H., Oberdörster, G., and Ziesenis, A.** (2002). Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health* 65, 1513-1530.
- Krug, H.F., Kern, K., Diabaté, S.** (2004). Toxikologische Aspekte der Nanotechnologie. Versuch einer Abwägung. In *Technikfolgenabschätzung – Theorie und Praxis*, pp. 58-64.
- Künzli, N., Jerrett, M., Mack, W.J., Beckerman, B., LaBree, L., Gilliland, F., Thomas, D., Peters, J., and Hodis, H.N.** (2005). Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environ Health Perspect* 113, 201-206.
- Kvietys, P.R., and Sandig, M.** (2001). Neutrophil diapedesis: paracellular or transcellular? *News Physiol Sci* 16, 15-19.
- Laudanna, C., and Alon, R.** (2006). Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. *Thromb Haemost* 95, 5-11.
- Laurens, N., Koolwijk, P., and de Maat, M.P.** (2006). Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost* 4, 932-939.
- Lerman, A., and Zeiher, A.M.** (2005). Endothelial function: cardiac events. *Circulation* 111, 363-368.
- Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., and Nel, A.** (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Persp* 111, 455-460.
- Li, X.Y., Brown, D., Smith, S., MacNee, W., and Donaldson, K.** (1999). Short-term inflammatory responses following intratracheal instillation of fine and ultrafine carbon black in rats. *Inhal Toxicol* 11, 709-731.
- Liao, D., Creason, J., Shy, C., Williams, R., Watts, R., and Zweidinger, R.** (1999). Daily variation of particulate air pollution and poor cardiac autonomic control in the elderly. *Environ Health Perspect* 107, 521-525.
- Liou, Y.M., Chang, L.Y., Liaw, J.M., and Jiang, M.J.** (2005). Osteopontin gene expression in the aorta and the heart of propylthiouracil-induced hypothyroid mice. *J Biomed Sci* 12, 869-880.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- MacNee, W., Li, X.Y., Gilmour, P., and Donaldson, K.** (2000). Systemic effect of particulate air pollution. *Inhal Toxicol* 12, 233-244.
- Martin, J.F., Trowbridge, E.A., Salmon, G., and Plumb, J.** (1983). The biological significance of platelet volume: its relationship to bleeding time, platelet thromboxane B2 production and megakaryocyte nuclear DNA concentration. *Thromb Res* 32, 443-460.

- Matuschek, G., Karg, E., Schroepel, A., Schulz, H., and Schmid, O.** (2007). Chemical investigation of eight different types of carbonaceous particles using thermoanalytical techniques. *Environmental Science & Technology* in press, 1-21.
- Mills, N.L., Amin, N., Robinson, S.D., Anand, A., Davies, J., Patel, D., de la Fuente, J.M., Cassee, F.R., Boon, N.A., Macnee, W., et al.** (2006). Do inhaled carbon nanoparticles translocate directly into the circulation in humans? *Am J Respir Crit Care Med* 173, 426-431.
- Morris, R.D., Naumova, E.N., and Munasinghe, R.L.** (1995). Ambient air pollution and hospitalization for congestive heart failure among elderly people in seven large US cities. *Am J Public Health* 85, 1361-1365.
- Nadziejko, C., Fang, K., Narciso, S., Zhong, M., Su, W.C., Gordon, T., Nadas, A., and Chen, L.C.** (2004). Effect of particulate and gaseous pollutants on spontaneous arrhythmias in aged rats. *Inhal Toxicol* 16, 373-380.
- Nemmar, A., Al-Maskari, S., Ali, B.H., and Al-Amri, I.S.** (2007). Cardiovascular and lung inflammatory effects induced by systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L664-670.
- Nemmar, A., Hoet, P.H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M.F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L., and Nemery, B.** (2002a). Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 105, 411-414.
- Nemmar, A., Hoet, P.H.M., Dinsdale, D., Vermynen, J., Hoylaerts, M.F., and Nemery, B.** (2003a). Diesel Exhaust Particles in Lung Acutely Enhance Experimental Peripheral Thrombosis. *Circulation* 107, 1202-1208.
- Nemmar, A., Hoylaerts, M.F., Hoet, P.H., Dinsdale, D., Smith, T., Xu, H., Vermynen, J., and Nemery, B.** (2002b). Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 998-1004.
- Nemmar, A., Hoylaerts, M.F., Hoet, P.H., Vermynen, J., and Nemery, B.** (2003b). Size effect of intratracheally instilled particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 186, 38-45.
- Nemmar, A., Vanbilloen, H., Hoylaerts, M.F., Hoet, P.H.M., Verbuggen, A., and Nemery, B.** (2001). Passage of Intratracheally Instilled Ultrafine Particles from the Lung into the Systemic Circulation in Hamster. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1665-1668.
- Nurkiewicz, T.R., Porter, D.W., Barger, M., Millecchia, L., Rao, K.M., Marvar, P.J., Hubbs, A.F., Castranova, V., and Boegehold, M.A.** (2006). Systemic microvascular dysfunction and inflammation after pulmonary particulate matter exposure. *Environ Health Perspect* 114, 412-419.
- Oberdörster, G., Ferin, J., and Lehnert, B.E.** (1994). Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Persp* 102 Suppl 5, 173-179.
- Oberdorster, G., Finkelstein, J.N., Johnston, C., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., and Elder, A.C.** (2000). Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst*, 5-74; disc 75-86.

- Oberdörster, G., Gelein, R.M., Ferin, J., and Weiss, B.** (1995). Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles? *Inhal Toxicol* 7, 111-124.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E., and Oberdorster, J.** (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113, 823-839.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W.G., and Cox, C.** (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health* 65, 1531-1543.
- Pekkanen, J., Brunner, E.J., Anderson, H.R., Tiittanen, P., and Atkinson, R.W.** (2000). Daily concentrations of air pollution and plasma fibrinogen in London. *Occup Environ Med* 57, 818-822.
- Pekkanen, J., Peters, A., Hoek, G., Tiittanen, P., Brunekreef, B., de Hartog, J., Heinrich, J., Ibaldo-Mulli, A., Kreyling, W.G., Lanki, T., et al.** (2002). Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease: the Exposure and Risk Assessment for Fine and Ultrafine Particles in Ambient Air (ULTRA) study. *Circulation* 106, 933-938.
- Penttinen, P., Timonen, K.L., Tiittanen, P., Mirme, A., Ruuskanen, J., and Pekkanen, J.** (2001a). Number concentration and size of particles in urban air: effects on spirometric lung function in adult asthmatic subjects. *Environ Health Perspect* 109, 319-323.
- Penttinen, P., Timonen, K.L., Tiittanen, P., Mirme, A., Ruuskanen, J., and Pekkanen, J.** (2001b). Ultrafine particles in urban air and respiratory health among adult asthmatics. *Eur Respir J* 17, 428-435.
- Peters, A.** (2005). Particulate matter and heart disease: Evidence from epidemiological studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 207, 477-482.
- Peters, A., Dockery, D.W., Muller, J.E., and Mittleman, M.A.** (2001). Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* 103, 2810-2815.
- Peters, A., Liu, E., Verrier, R.L., Schwartz, J., Gold, D.R., Mittleman, M., Baliff, J., Oh, J.A., Allen, G., Monahan, K., et al.** (2000). Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology* 11, 11-17.
- Peters, A., Perz, S., Döring, A., Stieber, J., Koenig, W., and Wichmann, H.E.** (1999). Increases in heart rate during an air pollution episode. *Am J Epidemiol* 150, 1094-1098.
- Peters, A., Wichmann, H.E., Tuch, T., Heinrich, J., and Heyder, J.** (1997). Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 1376-1383.
- Pietropaoli, A.P., Frampton, M.W., Hyde, R.W., Morrow, P.E., Oberdorster, G., Cox, C., Speers, D.M., Frasier, L.M., Chalupa, D.C., Huang, L.S., et al.** (2004). Pulmonary function, diffusing capacity, and inflammation in healthy and asthmatic subjects exposed to ultrafine particles. *Inhal Toxicol* 16 Suppl 1, 59-72.

- Pope, C.A., 3rd, Burnett, R.T., Thurston, G.D., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., and Godleski, J.J.** (2004a). Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* 109, 71-77.
- Pope, C.A., 3rd, Hansen, M.L., Long, R.W., Nielsen, K.R., Eatough, N.L., Wilson, W.E., and Eatough, D.J.** (2004b). Ambient particulate air pollution, heart rate variability, and blood markers of inflammation in a panel of elderly subjects. *Environ Health Perspect* 112, 339-345.
- Prigent, H., Maxime, V., and Annane, D.** (2004). Clinical review: corticotherapy in sepsis. *Crit Care* 8, 122-129.
- Radomski, A., Jurasz, P., Alonso-Escolano, D., Drews, M., Morandi, M., Malinski, T., and Radomski, M.W.** (2005). Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br J Pharmacol* 146, 882-893.
- Rahman, I., Biswas, S.K., Jimenez, L.A., Torres, M., and Forman, H.J.** (2005). Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxid Redox Signal* 7, 42-59.
- Ratjen, F., Havers, W., and Braun, J.** (1999). Intrapulmonary protein leakage in immunocompromised children and adults with pneumonia. *Thorax* 54, 432-436.
- Riediker, M., Cascio, W.E., Griggs, T.R., Herbst, M.C., Bromberg, P.A., Neas, L., Williams, R.W., and Devlin, R.B.** (2004). Particulate matter exposure in cars is associated with cardiovascular effects in healthy young men. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 934-940.
- Riley, J.K., Takeda, K., Akira, S., and Schreiber, R.D.** (1999). Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274, 16513-16521.
- Roth, C., Ferron, G.A., Karg, E., Lentner, B., Schumann, G., Takenaka, S., and Heyder, J.** (2004). Generation of ultrafine particles by spark discharging. *Aerosol Science and Technology* 38, 228-235.
- Ruckerl, R., Ibal-Mulli, A., Koenig, W., Schneider, A., Woelke, G., Cyrys, J., Heinrich, J., Marder, V., Frampton, M., Wichmann, H.E., et al.** (2006). Air pollution and markers of inflammation and coagulation in patients with coronary heart disease. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 432-441.
- Rückerl, R., Phipps, R.P., Schneider, A., Frampton, M., Cyrys, J., Oberdorster, G., Wichmann, H.E., and Peters, A.** (2007). Ultrafine particles and platelet activation in patients with coronary heart disease - results from a prospective panel study. *Part Fibre Toxicol* 4, 1.
- Sahu, A., and Lambris, J.D.** (2001). Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev* 180, 35-48.

- Salvi, S., Blomberg, A., Rudell, B., Kelly, F., Sandstrom, T., Holgate, S.T., and Frew, A.** (1999). Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 159, 702-709.
- Salvi, S.S., Nordenhall, C., Blomberg, A., Rudell, B., Pourazar, J., Kelly, F.J., Wilson, S., Sandstrom, T., Holgate, S.T., and Frew, A.J.** (2000). Acute exposure to diesel exhaust increases IL-8 and GRO- $\alpha$  production in healthy human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 161, 550-557.
- Sasmono, R.T., Ehrnsperger, A., Cronau, S.L., Ravasi, T., Kandane, R., Hickey, M.J., Cook, A.D., Himes, S.R., Hamilton, J.A., and Hume, D.A.** (2007). Mouse neutrophilic granulocytes express mRNA encoding the macrophage colony-stimulating factor receptor (CSF-1R) as well as many other macrophage-specific transcripts and can transdifferentiate into macrophages in vitro in response to CSF-1. *J Leukoc Biol* 82, 111-123.
- Schikowski, T., Sugiri, D., Ranft, U., Gehring, U., Heinrich, J., Wichmann, H.E., and Kramer, U.** (2005). Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women. *Respir Res* 6, 152.
- Schulz, H.** (2006). Feinstaub: Gefahr für Lunge und Kreislauf?  
Fine Particulate Matter - A Health Hazard for Lungs and Other Organs? *Pneumologie* 60, 611-615.
- Schulz, H., Harder, V., Ibal-Mulli, A., Khandoga, A., Koenig, W., Krombach, F., Radekewicz, R., Stampfl, A., Thorand, B., and Peters, A.** (2005). Cardiovascular effects of fine and ultrafine particles. *J Aerosol Med* 18, 1-22.
- Schwartz, J.** (2001). Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. *Environ Health Perspect* 109 Suppl 3, 405-409.
- Schwartz, J., and Morris, R.** (1995). Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Detroit, Michigan. *Am J Epidemiol* 142, 23-35.
- Schwartz, J., Park, S.K., O'Neill, M.S., Vokonas, P.S., Sparrow, D., Weiss, S., and Kelsey, K.** (2005). Glutathione-S-transferase M1, obesity, statins, and autonomic effects of particles: gene-by-drug-by-environment interaction. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 1529-1533.
- Schwartz, J.D., Monea, S., Marcus, S.G., Patel, S., Eng, K., Galloway, A.C., Mignatti, P., and Shamamian, P.** (1998). Soluble factor(s) released from neutrophils activates endothelial cell matrix metalloproteinase-2. *J Surg Res* 76, 79-85.
- Schwarz, E.R., Meven, D.A., Sulemanjee, N.Z., Kersting, P.H., Tussing, T., Skobel, E.C., Hanrath, P., and Uretsky, B.F.** (2004). Monocyte chemoattractant protein 1-induced monocyte infiltration produces angiogenesis but not arteriogenesis in chronically infarcted myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 9, 279-289.
- Seaton, A., MacNee, W., Donaldson, K., and Godden, D.** (1995). Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet* 345, 176 - 178.

- Seaton, A., Soutar, A., Crawford, V., Elton, R., McNerlan, S., Cherrie, J., Watt, M., Agius, R., and Stout, R.** (1999). Particulate air pollution and the blood. *Thorax* 54, 1027-1032.
- Semmler, M., Seitz, J., Erbe, F., Mayer, P., Heyder, J., Oberdorster, G., and Kreyling, W.G.** (2004). Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol* 16, 453-459.
- Sen, C.K., Roy, S., and Packer, L.** (1996). Involvement of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in oxidant-induced NF-kappa B activation. *FEBS Lett* 385, 58-62.
- Simon, B.C., Noll, B., and Maisch, B.** (1999). [Endothelial dysfunction--assessment of current status and approaches to therapy]. *Herz* 24, 62-71.
- Siow, R.C., Sato, H., and Mann, G.E.** (1999). Heme oxygenase-carbon monoxide signalling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic actions of bilirubin and carbon monoxide? *Cardiovasc Res* 41, 385-394.
- Stenfors, N., Nordenhall, C., Salvi, S.S., Mudway, I., Soderberg, M., Blomberg, A., Helleday, R., Levin, J.O., Holgate, S.T., Kelly, F.J., et al.** (2004). Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. *Eur Respir J* 23, 82-86.
- Stoeger, T., Reinhard, C., Takenaka, S., Schroepel, A., Karg, E., Ritter, B., Heyder, J., and Schulz, H.** (2006). Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ Health Perspect* 114, 328-333.
- Stoeger, T., Schmid, O., Takenaka, S., and Schulz, H.** (2007). Inflammatory response to  $\text{TiO}_2$  and carbonaceous particles scales best with BET surface area. *Environ Health Perspect* 115, A290-291; author reply A291-292.
- Stone, V., Shaw, J., Brown, D.M., MacNee, W., Faux, S.P., Donaldson, K.** (1998). The role of oxidative stress in the prolonged inhibitory effect of ultrafine carbon black on epithelial cell function. *Toxicol In Vitro* 12, 649-659.
- Stone, V., Tuinman, M., Vamvakopoulos, J.E., Shaw, J., Brown, D., Petterson, S., Faux, S.P., Borm, P., MacNee, W., Michaelangeli, F., et al.** (2000). Increased calcium influx in a monocytic cell line on exposure to ultrafine carbon black. *Eur Respir J* 15, 297-303.
- Sun, Q., Wang, A., Jin, X., Natanzon, A., Duquaine, D., Brook, R.D., Aguinaldo, J.G., Fayad, Z.A., Fuster, V., Lippmann, M., et al.** (2005). Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *JAMA* 294, 3003-3010.
- Suwa, T., Hogg, J.C., Klut, M.E., Hards, J., and van Eeden, S.F.** (2001). Interleukin-6 changes deformability of neutrophils and induces their sequestration in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 970-976.



- Suwa, T., Hogg, J.C., Quinlan, K.B., Ohgami, A., Vincent, R., and van Eeden, S.F.** (2002a). Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 39, 935-942.
- Suwa, T., Hogg, J.C., Quinlan, K.B., and Van Eeden, S.F.** (2002b). The effect of interleukin-6 on L-selectin levels on polymorphonuclear leukocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H879-884.
- Takenaka, S., Karg, E., Kreyling, W.G., Lentner, B., Moller, W., Behnke-Semmler, M., Jennen, L., Walch, A., Michalke, B., Schramel, P., et al.** (2006). Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal Toxicol* 18, 733-740.
- Takenaka, S., Karg, E., Roth, C., Schulz, H., Ziesenis, A., Heinzmann, U., Schramel, P., and Heyder, J.** (2001). Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Persp* 109, 547-551.
- Tan, W.C., Qiu, D., Liam, B.L., Ng, T.P., Lee, S.H., van Eeden, S.F., D'Yachkova, Y., and Hogg, J.C.** (2000). The human bone marrow response to acute air pollution caused by forest fires. *Am J Respir Crit Care Med* 161, 1213-1217.
- Tao, F., Gonzalez-Flecha, B., and Kobzik, L.** (2003). Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. *Free Radic Biol Med* 35, 327-340.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24, 145-149.
- Tsakadze, N.L., Zhao, Z., and D'Souza, S.E.** (2002). Interactions of intercellular adhesion molecule-1 with fibrinogen. *Trends Cardiovasc Med* 12, 101-108.
- Ulrich, M.M., Alink, G.M., Kumarathasan, P., Vincent, R., Boere, A.J., and Cassee, F.R.** (2002). Health effects and time course of particulate matter on the cardiopulmonary system in rats with lung inflammation. *J Toxicol Environ Health A* 65, 1571-1595.
- Utell, M.J., and Frampton, M.W.** (2000). Acute health effects of ambient air pollution: the ultrafine particle hypothesis. *J Aerosol Med* 13, 355-359.
- Utell, M.J., Samet, J.M., Bates, D.V., Becklake, M.R., Dockrey, D.W., Leaderer, B.P., Mauderly, J.L., and Speizer, F.E.** (1988). Air pollution and health. *Amer Rev Respir Dis* 138 (4), 1065 - 1068.
- Vallet, B.** (2003). Bench-to-bedside review: endothelial cell dysfunction in severe sepsis: a role in organ dysfunction? *Crit Care* 7, 130-138.
- van Eeden, S.F., Tan, W.C., Suwa, T., Mukae, H., Terashima, T., Fujii, T., Qui, D., Vincent, R., and Hogg, J.C.** (2001). Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med* 164, 826-830.

- van Eeden, S.F., Yeung, A., Quinlam, K., and Hogg, J.C.** (2005). Systemic response to ambient particulate matter: relevance to chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2, 61-67.
- Vermeire, S., Van Assche, G., and Rutgeerts, P.** (2004). C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 10, 661-665.
- Vincent, R., Kumarathasan, P., Goegan, P., Bjarnason, S.G., Guenette, J., Berube, D., Adamson, I.Y., Desjardins, S., Burnett, R.T., Miller, F.J., et al.** (2001). Inhalation toxicology of urban ambient particulate matter: acute cardiovascular effects in rats. *Res Rep Health Eff Inst*, 5-54; discussion 55-62.
- Vinzents, P.S., Moller, P., Sorensen, M., Knudsen, L.E., Hertel, O., Jensen, F.P., Schibye, B., and Loft, S.** (2005). Personal exposure to ultrafine particles and oxidative DNA damage. *Environ Health Persp* 113, 1485-1490.
- von Klot, S., Wolke, G., Tuch, T., Heinrich, J., Dockery, D.W., Schwartz, J., Kreyling, W.G., Wichmann, H.E., and Peters, A.** (2002). Increased asthma medication use in association with ambient fine and ultrafine particles. *Eur Respir J* 20, 691-702.
- Wallenborn, J.G., Schladweiler, M.C., Nyska, A., Johnson, J.A., Thomas, R., Jaskot, R.H., Richards, J.H., Ledbetter, A.D., and Kodavanti, U.P.** (2007). Cardiopulmonary responses of Wistar Kyoto, spontaneously hypertensive, and stroke-prone spontaneously hypertensive rats to particulate matter (PM) exposure. *J Toxicol Environ Health A* 70, 1912-1922.
- Wang, Y., Kinzie, E., Berger, F.G., Lim, S.K., and Baumann, H.** (2001). Haptoglobin, an inflammation-inducible plasma protein. *Redox Rep* 6, 379-385.
- Ware, J.H., Ferris, B.G., Dockery, D.W., Spengler, J.D., Stram, D.O., and Speizer, F.E.** (1986). Effects of ambient sulfur oxides and suspended particles on respiratory health of pre-adolescent children. *Amer Rev Respir Dis* 133, 834 - 842.
- Wichmann, H.E., Spix, C., Tuch, T., Wolke, G., Peters, A., Heinrich, J., Kreyling, W.G., and Heyder, J.** (2000). Daily mortality and fine and ultrafine particles in Erfurt, Germany part I: role of particle number and particle mass. *Res Rep Health Eff Inst*, 5-86; discussion 87-94.
- Xia, T., Korge, P., Weiss, J.N., Li, N., Venkatesen, M.I., Sioutas, C., and Nel, A.** (2004). Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect* 112, 1347-1358.
- Yusuf, S., Reddy, S., Ounpuu, S., and Anand, S.** (2001). Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 104, 2746-2753.
- Zareba, W., Nomura, A., and Couderc, J.P.** (2001). Cardiovascular effects of air pollution: what to measure in ECG? *Environ Health Perspect* 109 Suppl 4, 533-538.
- Zucker-Franklin, D., and Philipp, C.S.** (2000). Platelet production in the pulmonary capillary bed - New ultrastructural evidence for an old concept. *American Journal of Pathology* 157, 69-74.

## 8 Anhang

### 8.1 Material

#### 8.1.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
ACE	Angiotensin cleaving enzyme
ACRP30	Adiponektin
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BAL(F)	Bronchoalveoläre Lavage (Flüssigkeit)
BASO	Basophile Granulozyten
BET	Brunauer-Emmett-Teller (Größenbestimmung von Oberflächen)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine serum albumin
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosine
CAP	Concentrated ambient particles
CCL11	Eotaxin
CCL2	Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1
CCL3	MIP-1-alpha
CCL4	MIP-1-beta
CCL5	T-cell-specific protein, RANTES
CD11b	Integrin alpha M (MAC-1)
CD18	Beta-2 Integrin (MAC-1)
CD49d	Integrin alpha 4 (VLA-4)
CD54	ICAM-1
cDNA	complementary DNA
CMD	count median diameter (Mediandurchmesser der Anzahldichte)
CRP	C-reactives Protein
CT	Threshold-cycle (Schwellenwert-Zyklus)
CVD	cardiovascular disease
CXCL1	Growth-regulated alpha protein, KC
CXCL12	Stromal cell-derived factor 1, SDF-1
CXCL2	Macrophage inflammatory protein 2, MIP2
d	Dichte
d <sub>agg</sub>	Mobilitätsdurchmesser des Agglomerates
ddCT	delta-delta-Threshold-Cycle
ddH <sub>2</sub> O	2-fach destilliertes Wasser
DEP	Diesel exhaust particle
Dep	Deposition
D <sub>f</sub>	fraktale Dimension

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-desoxynukleosid 5'-triphosphat
d <sub>pp</sub>	Dichte der Primärpartikel
ds	Double strand(ed)
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor (Synonym für NO)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
EOS	Eosinophile Granulozyten
E-Selektin	Endothelial leukocyte adhesion molecule 1, CD62E Antigen
f	Atemfrequenz
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FMO	fluorescence minus one
FSC	forward-scatter
fw	Forward
g	Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor, CSF3
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor, CSF2
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidierte Form von GSH)
Hg	Hämoglobin
HR	Herzschlagfrequenz
HRP	Meerrettichperoxidase
HRV	Herzschlagfrequenzvariabilität
HTS	High-Throughput-Screening (mit 96-well Mikrotiterplatten)
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1, CD54
IFN-gamma	Interferon gamma
IHC	Immunohistochemie
IkBb	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta
IL-x	Interleukin-x
iNOS	induzierbare NO-Synthase
kb	Kilo (1000) Basenpaare
KC	CXCL1
kDa	Kilo Dalton
k <sub>f</sub>	Konstante k <sub>f</sub>
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
l	Liter
Large PLT	Large platelets, Riesenthrombozyten
LDH	Laktat-Dehydrogenase
L-Selektin	Leukocyte adhesion molecule 1, CD62L Antigen
Ly6G	Myeloid differentiation antigen Gr1, Expression auf neutrophile Granulozyten
Lympho	Lymphozyten
M	Molar (mol/l)
m	Masse

---

MAC-1	Integrin Rezeptor MAC-1 (CD11b, CD18)
M <sub>agg</sub>	Agglomeratmasse
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1, CCL2
min	Minute(n)
mM	Millimolar
MMD	Massenmediandurchmesser
MMP2	Matrix metalloproteinase-2
MMP9	Matrix metalloproteinase-9
Mono	Monozyten
MPC	mean platelet component
MPM	mean platelet mass
M <sub>pp</sub>	Masse eines Primärpartikels
MPV	mean platelet volume
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N <sub>agg</sub>	Anzahl der Agglomerate
Neutro	Neutrophile Granulozyten
NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
NO	Stickstoffmonoxid
N <sub>pp</sub>	Anzahl der kugelförmigen Primärpartikel pro Agglomerat
ns	(statistisch) nicht signifikant
nt	Nukleotid(e)
N <sub>Trans</sub>	Anzahl der translozierten Partikel
NY	New York
OOR	out of range
OR	Odds ratio, statistisches Quotenverhältnis
P90	Printex90 (ultrafeine Kohlenstoffpartikel)
PAF	Platelet activating factor
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline - Tween
PCDW	platelet component distribution width
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PCT	platelet crit
PDGF-AA	Platelet-derived growth factor A chains (Dimer)
PDGF-BB	Platelet-derived growth factor B chains (Dimer)
PDW	platelet distribution width
PE	phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	propidiumjodid
PLT	Thrombozyten
PM	Particulate matter, Umweltpartikel

---

PMDW	platelet mass distribution width
PMT	photomultiplier
P-Selektin	Leukocyte-endothelial cell adhesion molecule 3, CD62P Antigen
RBC	Erythrozyten
rev	Reverse
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROFA	Residual oil fly ash
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real time - Polymerase chain reaction
SCS	single color staining
SEM	standard error of the mean (Standard Fehler)
SM	Submucosa
SOD	Superoxiddismutase
SPP1	Osteopontin
ss	Single stranded
SSC	sideward-scatter
Std	Stunde(n)
ST-Segment	ST-Segmentdepression
Sy	Streptavidin
TBE	Tris Borat – EDTA
TF	tissue factor, Thromboplastin, F3
TGF-beta-1	Transforming growth factor beta-1
TiO <sub>2</sub>	Titanium dioxide
TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha
TNF-RI	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A
total PAI-1	Total Plasminogen activator inhibitor 1
Trans	Translokationseffizienz
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TritonX-100	Polyethylene glycol tert-octylphenyl ether
TSP	Total suspended particles
U	Unit
UfCP	Ultra fine carbon particle, ultrafeine Kohlenstoffpartikel
UfP	ultrafeine Partikel
V	Volt
VCAM-1	Vascular adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLA-4	Integrin Rezeptor VLA-4 (CD49d, CD29)
V <sub>T</sub>	Atemzugvolumen
vWF	von-Willebrand-Faktor
WBC	Leukozyten

## 8.1.2 Geräteliste

96-Loch Mikrotiterplatten	Becton Dickinson, Heidelberg
ABI Prism 7000 Sequence Detec. System	Nunc, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Binokular	Applied Biosystems, USA
Coverplates™	Stemi SV8, Zeiss, Jena
Deckgläser	Shandon, Astmor, England
Dreiwegehahn (Discofix)	Menzel, Braunschweig
Durchflusszytometer	Braun, Melsungen
EDTA-Röhrchen	BD LSRII, Becton Dickinson, Heidelberg
Einbettförmchen	Mikrovette, Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf
Elektromobilitätsspektrometer	Shandon, Astmor, England
FastPrep Instrument	Modell EMS150, Hauke, Gmunden, Österreich
Filter	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Funkengenerator GFG 1000	Steritop (0,22 µm; 0,1 µm), Millipore, USA
Gel Dokumentation	Palas, Karlsruhe
Gelelektrophorese Apparatur	Syngene, England
Gelelektrophorese Kammer	Xcell SureLock Mini-Cell, Invitrogen, Karlsruhe
Glas-Kapillar-pipetten (EDTA)	PeqLab Biotechnology GmbH, Erlangen
Glaswaren	Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf
Hämazytometer (Neubauer)	Braun, Melsungen
Hybond ECL Nitrozellulose Membran	Schott, Mainz
Infusionsbesteck (Infusomat-Leitung)	Adaltis Deutschland GmbH, Freiburg
Kanülen	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
Kondensationszähler	Braun, Melsungen
Kühl- und Gefrierschränke	Sterican Z, 0,3 x 12mm, Braun, Melsungen
Katheter	Braun, Melsungen
Luminex 100	Typ CPC 3022A, TSI, St. Paul, USA
Lysing matrix Säulen	Liebherr GmbH, Lienz
MagicMark XP Western Protein Standard	0,61mm/0,41mm, Portex, Hythe, England
Magnetrührer	Smith Medical, Grasbrunn
Malvern HPPS ( <i>particlesizer</i> )	Bio-Rad, München
Mikroskop	Invitrogen, Karlsruhe
Mikrowaage	Invitrogen, Karlsruhe
Multipette	Ikamag RCT, IKA-Labortechnik, Staufen
Nassblotkammer (Xcell II Blot Module)	Malvern Instruments GmbH, Herrenberg
Nitrozellulosemembran	Leitz Diaplan, WILD Leitz AG, Heerbrugg
Objektträger	Typ AT250, Mettler, Gießen
Paraffinausgießstation	Multipette plus, Eppendorf, Hamburg
PCR - Thermo- Fast 96 Detection Plates	Invitrogen, Karlsruhe
pH Meter	Invitrogen, Karlsruhe
Pipetten	Superfrost, Menzel, Braunschweig
	Histocentre 2, Shandon, Astmor, England
	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
	InoLab pH Level 1, England
	Gilson, USA
	Pipetus®, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Pipettenspitzen	Diamond, Gilson, USA
Power Supply (PowerEase 500)	Invitrogen, Karlsruhe
Reaktionsgefäße	15 ml, 50 ml falcon tubes, Becton Dickinson, USA Eppendorf, Hamburg; 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml FACS-Röhrchen, Falcon, USA PCR tubes, Biozym Diagnostiks, Oldendorf GE Healthcare, Buckinghamshire, England
Röntgenfilm	Reichert-Jung, USA
Rotationsmikrotom, 2040 Autocut	Modell MD19, Matter Engineering, Schweiz
Rotationsverdünner	Heidolph Reax 2000
Schüttler	HLC Haep Labor Consult, Bovenden KS 250 Kreisschüttler, IKA, Staufen Mini-Shaker, Braun, Melsungen Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg Vortex, Bender & Hobein AG, Schweiz
Sequenza Slide Rack™	Shandon; 7331017
Spritze (Omnifix)	Braun-Melsungen, Nr.: 4616022,
Spritzen (1 ml)	Kendall monoject, Tyco Healthcare, UK
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Sterilisator	KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Stromversorgung	Bio-Rad, München
T-Stück Apparatur	Eigenproduktion; HZM, Neuherberg
Ultraschalllanze	Dumag, Wien
Wasserbad	GFL Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifugen	Cytospin 2, Shandon, Astmor, England Eppendorf centrifuge 5415c, Eppendorf, Hamburg Galaxy 16DH, VWR Hettich Zentrifugen, Universal 32 R Mini-Shaker, Braun, Melsungen Multifuge 3 S-R, Heraeus, Hanau Sigma Laborzentrifugen 1-15 K, 3 K 15

### 8.1.3 Computerprogramme

Abbildungen	Adobe Photoshop 7.0, Adobe Inc.
Abbildungen	Adobe Acrobat 7.0, Adobe Inc.
Abbildungen	Microsoft Power Point 2003, Microsoft
Abgleich von Sequenzen	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
ADVIA 120 Auswertung	ADVIA 120 Software; Bayer, Fernwald
Berechnungen, Diagramme und Tabellen	Microsoft® Excel for Windows, MS Office 2003
Bioplex Auswertung	Bio-Plex-Manager-Version 3.0-Software
FACS Auswertung	FlowJo Version 7.2.2 (Tree Star Inc., Ashland, USA)
Literaturrecherchen	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/</a>



---

Oligonucleotid-Konstruktion	<a href="http://primer3.sourceforge.net/">Primer3 open source software (http://primer3.sourceforge.net/)</a>
Quantitative Auswertung von Westernblots	Syngene Software Image, Cambridge, UK
Sequenzsuche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Statistik	Microsoft® Excel for Windows, MS Office 2003
Textverarbeitung	Microsoft® Word for Windows, MS Office 2003

### 8.1.4 Chemikalien

0,25% Trypsin-EDTA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
10x DTT 0,1 M	Superscript-Kit, Invitrogen, Karlsruhe
4dNTPmix 10 mM each, 20X	Invitrogen, Karlsruhe
5x First Strand Buffer	Superscript-Kit, Invitrogen, Karlsruhe
ABsolute qPCR SYBR Green ROX Mix	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Agarose	Biozym, Hess, Oldendorf
Alkohol	Merck KG aA, Darmstadt
Ammoniumacetat	Merck KG aA, Darmstadt
Augensalbe	Bepanthen, Roche
Biorad-Proteinreagenz	Bio-Rad, Deutschland
Borsäure	Merck KG aA, Darmstadt
BSA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Chloroform	Merck KG aA, Darmstadt
Citrat buffer pH 6.0 (10X)	DAKO, Glostrup, Dänemark, S2031
DEPC	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DNA/RNA loading dye	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Leiter, ultra low range 300-10 bp	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP mix	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
ECL Plus Detektionssystem	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
Ethanol	Merck KG aA, Darmstadt
Flüssigstickstoff (N <sub>2</sub> ), liquid (-196°C)	Linde AG, München
Formaldehyd Lösung 4%	Fischar, Saarbrücken
Giemsa-Lösung	Merck KG aA, Darmstadt
Glycin	Merck KG aA, Darmstadt
Glycogen (20 mg/ml)	Merck KG aA, Darmstadt
Graphit-elektroden	Elektrodentyp RW-0, SGL-Carbon, Wiesbaden
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)	Roth, Karlsruhe
Hematoxilin	H-3401, Vector Laboratories, Canada
Isopropanol	Merck KG aA, Darmstadt
Isotonische NaCl-Lösung 0,9%	Braun, Melsungen
Klebstoff	Entellan, Merck KG aA, Darmstadt
Loading Dye Solution 6X	Fermentas, St. Leon-Rot
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
MagicMark XP Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe
May-Grünwald-Lösung	Merck KG aA, Darmstadt

---

Methanol	Merck KG aA, Darmstadt
Methanol	Merck KG aA, Darmstadt
Methanol	Merck KG aA, Darmstadt
Na <sub>2</sub> EDTAx2H <sub>2</sub> O	Merck KG aA, Darmstadt
N-Acetylcystein	Merck KG aA, Darmstadt
NH <sub>4</sub> Ac 10mM	Merck KG aA, Darmstadt
NH <sub>4</sub> OH (25% stock; 13,4 M)	Merck KG aA, Darmstadt
Non essential amino acids 100x	Biochrom AG, Berlin
Nuclease freies Wasser	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE LDS Sample Buffer 4X (Ladepuffer)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE LDS Sample Buffer 4X (Ladepuffer)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE MOPS SDS Runningpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris-HCL Gel	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Sample Reducing Agent	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Sample Reducing Agent	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Transferbuffer 20X	Invitrogen, Karlsruhe
Paraffin (Histosec Pastillen, 56-58°C)	Merck KG aA, Darmstadt
Paraformaldehyd	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
PBS	Biochrom AG, Berlin
Ponceau S	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Powersupply (Power Pac Basic)	Bio-Rad, München
Printex90, Carbon Black	Degussa, Frankfurt
Protease-Inhibitor Cocktail III	Merck KG aA, Darmstadt
RNA Leiter, peQ Gold, high range, 200- 6000bp	PeqLab, Biotechnologie GmbH, Erlangen
RNAlater TM	Applied Biosystems, USA
RNAse Inhibitor 40 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
β-mercaptoethanol	Merck KG aA, Darmstadt
Stickstoff	Linde AG, München
Superscript II RT 200 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Gold, nucleic acid gel stain, 10.000X	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Safe, DNA Gel stain, 10.000X	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-Base	Merck KG aA, Darmstadt
Triton X-100	Merck KG aA, Darmstadt
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypan blau 0,4%	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tween20	Merck KG aA, Darmstadt
VectaMount™ Mounting Medium	H-5000, Vector Laboratories, Canada
Xylol	Merck KG aA, Darmstadt

### 8.1.5 Enzyme

Superscript II RT 200 U/ $\mu$ l  
DNaseI

Invitrogen, Karlsruhe  
Roche Applied Sciences, Basel

### 8.1.6 Gelmarker

DNA-Ladder, ultra low range 300-10 bp  
RNA Leiter, peQ Gold, hi. range, 200-6000bp  
MagicMark XP Western Protein Standard  
Loading Dye Solution 6X

Fermentas, St. Leon-Rot  
PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen  
Invitrogen, Karlsruhe  
Fermentas, St. Leon-Rot

### 8.1.7 Oligonukleotide für die RT-qPCR

Die nachfolgende Tabelle A1 listet die Gene mit den zugehörigen Primerpaaren auf, die für die quantitative RT-PCR-Analyse verwendet wurden. Die Nomenklatur der Gensymbole wurde entsprechend von MGI übernommen (*Mouse Genome Informatics*, <http://www.informatics.jax.org>). Die Sequenzen der Transkripte wurden über die *NCBI Reference Sequences ID* identifiziert. Die Primer wurden mittels der *Primer3 open source software* (<http://primer3.sourceforge.net/>) unter Verwendung folgender Konditionen abgeleitet: GC-Anteil: 55 - 60 %; *Annealing*: 55 °C; Primerlänge: 18 - 22 Basenpaare; Produktlänge: 135-225 Basenpaare.

**Tabelle A1: Primerliste der Genexpressionsanalyse**

RefSeq	Gen Name	Symbole	Primer Sequenz (5' - 3') – fw	Primer Sequenz (5' - 3') – rev
NM_207624	<i>angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1</i>	<b>Ace</b>	CTC AGC CTG GGA CTT CTA	CTT GGG GGT AGA CAC TGA G
NM_009662	<i>arachidonate 5-lipoxygenase</i>	<b>Alox5</b>	AGA GCA GGG AGA AGC TGT	CAC GGT CTG GTA GAG TAT CC
NM_009696	<i>apolipoprotein E</i>	<b>Apoe</b>	GGT CAC ATT GCT GAC AGG	AGT TCT GCA GCT CTT CCT
NM_011333	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>	<b>Ccl2</b>	CTT CTG GGC CTG CTG TTC A	CCA GCC TAC TCA TTG GGA TCA
NM_170701	<i>CD40 antigen</i>	<b>Cd40</b>	GTC ATC TGT GGT TTA AAG TCC CA	AGA GAA ACA CCC CGA AAA TGG
NM_011616	<i>CD40 ligand</i>	<b>Cd40lg</b>	CTC AAA CTC TGA ACA GTG CGC T	GGC AGG TCC TAA CTG ACT TGC T
NM_009853	<i>CD68 antigen</i>	<b>Cd68</b>	CCT CCA CCC TCG CCT AGT C	TTG GGT ATA GGA TTC GGA TTT GA
NM_009969	<i>colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)</i>	<b>Csf2</b>	GCC ATC AAA GAA GCC CTG	GCG GGT CTG CAC ACA TGT TA

NM_008176	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>	<b>Cxcl1</b>	CCG AAG TCA TAG CCA CAC	GTG CCA TCA GAG CAG TCT
NM_009140	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i>	<b>Cxcl2</b>	CTG TTG TGG CCA GTG AAC	GCC CTT GAG AGT GGC TAT
NM_009141	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 5</i>	<b>Cxcl5</b>	CCC TAC GGT GGA AGT CAT	CTT CAC TGG GGT CAG AGT
NM_010104	<i>endothelin 1</i>	<b>Edn1</b>	TTC CAG GTC CAA GCG TTC CT	GCT TGG CAG AAA TTC CAG CA
NM_010130	<i>EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1</i>	<b>Emr1</b>	CTC TGT GGT CCC ACC TTC AT	GAT GGC CAA GGA TCT GAA AA
NM_010171	<i>coagulation factor III</i>	<b>F3</b>	GAG CAA TGG AAG AGT TTC CT	GCA CAG AGA TAT GGA CAG
NM_010196	<i>fibrinogen, alpha polypeptide</i>	<b>Fga</b>	AGG GTC ACC TGC CTC ATC TT	ACA ACT CTT GGG CCA CGT AC
NM_181849	<i>fibrinogen, B beta polypeptide</i>	<b>Fgb</b>	TGA GGC ATC TAT GGC TGC T	TGT CAA CAG GTC GAT GAC CA
NM_133862	<i>fibrinogen, gamma polypeptide</i>	<b>Fgg</b>	AGC CCC CGA GTT TCC TTC TT	GGT GGT TGG GCA GAA ACT AC
NM_010233	<i>fibronectin 1</i>	<b>Fn1</b>	ACG TGC CTT TAG CAC AGA GG	CCC AGA GCC ATC TTG TTT TC
NM_010295	<i>glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit</i>	<b>Gclc</b>	GAG ACC CAC TCA CCC TTT	TCA CCC TAG TGA GCA GTA CC
NM_008181	<i>glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya)</i>	<b>Gsta1</b>	AGG AGA GAG CCC TGA TTG	CTG TTG CCC ACA AGG TAG
NM_010442	<i>heme oxygenase (de-cycling) 1</i>	<b>Hmox1</b>	AGG TGA TGC TGA CAG AGG	GTG TCT GGG ATG AGC TAG TG
NM_013556	<i>hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1</i>	<b>Hprt1</b>	GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GT	CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC
NM_010479	<i>heat shock protein 1A</i>	<b>Hspa1a</b>	GAC AAG TCG GAG AAC GTG	GAG TAG GTG GTG AAG GTC TG
NM_010493	<i>intercellular adhesion molecule</i>	<b>Icam1</b>	CCG CAG GTC CAA TTC ACA CT	TCC AGC CGA GGA CCA TAC AG
NM_008337	<i>interferon gamma</i>	<b>IFNg</b>	TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA	TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG
NM_010548	<i>interleukin 10</i>	<b>Il10</b>	TCT GTC TAG GTC CTG GAG TC	GGA GCA GGT GAA GAG TGA
NM_010554	<i>interleukin 1 alpha</i>	<b>Il1a</b>	AGC GCT CAA GGA GAA GAC	CTG TCA TAG AGG GCA GTC C
NM_008361	<i>interleukin 1 beta</i>	<b>Il1b</b>	CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC CAT G	GAT CCA CAC TCT CCA GCT GCA
NM_031168	<i>interleukin 6</i>	<b>Il6</b>	GCC AGA GTC CTT CAG AGA G	CCA CTC CTT CTG TGA CTC C
NM_1082960	<i>integrin alpha M</i>	<b>Itgam</b>	CCT CAA GGG CAA CCT ATC	GAC CTC ACA TAC GAC TCC TG
NM_008491	<i>lipocalin 2</i>	<b>Lcn2</b>	GAA GAA CCA AGG AGC TGT	TCA ATG CAT TGG TCG GTG
NM_010700	<i>low density lipoprotein receptor</i>	<b>Ldlr</b>	CAC TGT GGT AGC AGT GAG TG	GCT CAT GTC CTT GCA GTC

NM_010705	<i>lectin, galactose binding, soluble 3</i>	<b>Lgals3</b>	GAG CTA CAC ATC CCT AGC C	CTC AGG AGG ATC TGA GAC TG
NM_008517	<i>leukotriene A4 hydrolase</i>	<b>Lta4h</b>	CAG ATG GTT ACG GCT CTG	AGC TCT TGG TAG GTG TGG ACA G
U360142	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i>	<b>Ly6g</b>	TGG ACT CTC ACA GAA GCA AAG	GCA GAG GTC TTC CTT CCA ACA
NM_013599	<i>matrix metalloproteinase 9</i>	<b>Mmp9</b>	GAA GTG GGG TTT CTG TCC	AGC CCT CGA GGT AGC TAT AC
NM_010876	<i>neutrophil cytosolic factor 1</i>	<b>Ncf1</b>	CTG CTG TTG AAG AGG ACG AGA TG	AGC CGG TGA TAT CCC CTT TCC
NM_010877	<i>neutrophil cytosolic factor 2</i>	<b>Ncf2</b>	CTC GCC AGA ACA CAC TAA ACT GA	TCC TTC ATG CTT TCT TCG GAC AG
NM_010908	<i>nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta</i>	<b>Nfkbib</b>	CTG CAT CTA GCA GCC ATC	GGC TCT GAG TGA GGT AGG TA
NM_010927	<i>nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage</i>	<b>Nos2</b>	CCT GTG AGA CCT TTG ATG	CCT ATA TTG CTG TGG CTC
NM_008713	<i>nitric oxide synthase 3, endothelial cell</i>	<b>Nos3</b>	GTA GCC AAT GCA GTG AAG	CCT CAG AGC CAT ACA GAA
NM_138648	<i>oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1</i>	<b>Olr1</b>	AGA GGA GTC CCA GAG AGA AC	CTT GTG GAC AAG GAC CTG
AK084527	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i>	<b>Pecam1</b>	GTC TTG TCG CAG TAT CAG AAT TTC AG	TAC CAG GCC GCT TCT CTT GA
NM_013737	<i>phospholipase A2, group VII</i>	<b>Pla2g7</b>	CCT GCA AGC TGG AAT TCT CC	CCC ATT AGA TGC CAA GCC AA
NM_1081211	<i>platelet-activating factor receptor</i>	<b>Ptafr</b>	CAA CGA GGG CGA CTG GAT T	GAC ACC CAA AAA GGC CAC ACT
NM_008969	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 1</i>	<b>Ptgs1</b>	ACT GGT GGA TGC CTT CTC	GTA CAG CTC CTC CAA CTC AG
NM_011198	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>	<b>Ptgs2</b>	CAA CAC CTG AGC GGT TAC	GTT CCA GGA GGA TGG AGT
NM_013650	<i>S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)</i>	<b>S100a8</b>	CCG TCT TCA AGA CAT CGT TTG A	GTA GAG GGC ATG GTG ATT TCC T
NM_011315	<i>serum amyloid A 3</i>	<b>Saa3</b>	GAA GCT GGT CAA GGG TCT	GTC AGC TCT TGA GTC CTC TG
NM_011345	<i>selectin, endothelial cell</i>	<b>Sele</b>	GGC TGT AAA AGG GGC TAC	CTG TAC CCT TCC ACA CAG TC

NM_011347	<i>selectin, platelet</i>	<b>Selp</b>	TGC CCA AAA GGT TCC TGG A	GCA GCC ACT TCC TTC TGA TT
NM_011346	<i>selectin, lymphocyte</i>	<b>Sod3</b>	GCC TGA ACT TCA CCA GAG	CTA GGT CGA AGC TGG ACT C
NM_009263	<i>secreted phosphoprotein 1</i>	<b>Spp1</b>	AGC TCA GAG GAG AAG CTT	CTT CAG AGG ACA CAG CAT
NM_011577	<i>transforming growth factor, beta 1</i>	<b>Tgfb1</b>	TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG	GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC
NM_011580	<i>thrombospondin 1</i>	<b>Thbs1</b>	CTG GAC TTG CTG TAG GTT	AAC AAA GCC AGC GTA GTC
NM_013693	<i>tumor necrosis factor</i>	<b>Tnf</b>	CAC CAC GCT CTT CTG TCT	GGC TAC AGG CTT GTC ACT C
NM_011609	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a</i>	<b>Tnfrsf1a</b>	GAT ACA GTC TGC AGG GAG TG	CCT GAG TGA GAC ACA CTT CC
NM_011693	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>	<b>Vcam1</b>	GCC TCG CTA GGT TAC ACA	GGA CTG CCC TCC TCT AGT AT
NM_011708	<i>Von Willebrand factor homolog</i>	<b>Vwf</b>	AGC CTG AAT CCA CGC TTG A	ATA ACG GCA GTT CTG CAG

### 8.1.8 Kits

ABSolute qPCR SYBR Green ROX Mix	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Protein-Assay	Bio-Rad, München
Superscript-Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Bioplex 14-Zytokine-plex	Bio-Rad, München
Bioplex cytokine assay kit	Bio-Rad, München
Bioplex Serum Diluent	Bio-Rad, München
Lincoplex CVD 1 panel 2-plex	Millipore, USA
Lincoplex CVD 2 panel 5-plex	Millipore, USA

### 8.1.9 Puffer und Lösungen (Rezepte)

#### 8.1.9.1 Immunhistologie

– 4 % Paraformaldehyd:

2,8 g PFA

70 ml PBS

Lagerung bei 4 °C nach vollständiger Auflösung

– 10 x PBS (Stammlösung)

9,49 g PBS (Biochrom)

ad 1 l destilliertes Wasser

auf pH 7,4 einstellen

---

– 1 x PBS (Gebrauchslösung)

100 ml 10 x PBS  
Ad 1 l destilliertes Wasser

– 96 % Ethanol

40 ml destilliertes Wasser  
960 ml Ethanol 100 %

– 80 % Ethanol

200 ml destilliertes Wasser  
800 ml Ethanol 100%

– 70 % Ethanol

300 ml destilliertes Wasser  
700 ml Ethanol 100 %

– 1,8 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Methanol-Lösung (Gebrauchslösung)

6 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %, Stammlösung)  
80 ml Methanol  
14 ml destilliertes Wasser

– Citrat-Puffer

30 ml 10 x Citrat-Puffer (DAKO, Stammlösung)  
270 ml destilliertes Wasser  
auf pH 6,0 einstellen

– 2 % rabbit Serum (Gebrauchslösung, 3 ml)

2,94 ml 1 x PBS  
60 µl rabbit serum (VECTOR, S-5000, Stammlösung)

– NH<sub>4</sub>OH-Lösung (37 mM Gebrauchslösung, 1 l)

997,24 ml 70 % Ethanol  
2,76 ml NH<sub>4</sub>OH (25 % Stammlösung, Merck; 13,4 M)

### 8.1.9.2 Intraarterielle Infusion

– KHP (Stammlösungen zur Herstellung)

NaCl	67 g/l
KCl	11,01 g/250 ml
CaCl <sub>2</sub>	8,8 g/250 ml
MgSO <sub>4</sub>	7,26 g/250 ml
NaHCO <sub>3</sub>	20,9 g/l

– KHP (Gebrauchslösungen)

Glukose	2 g
NaCl	100 ml (Endkonzentration: 115 mM)
KCl	10 ml (Endkonzentration: 5,9 mM)
CaCl <sub>2</sub>	5 ml (Endkonzentration: 1,2 mM)
MgSO <sub>4</sub>	10 ml (Endkonzentration: 1,2 mM)
NaHCO <sub>3</sub>	100 ml (Endkonzentration: 25 mM)
ad 1 l destilliertes Wasser	

– Narkoselösung (für die Operation; 0,1 ml IP pro 10 g Körpergewicht)

1,00 ml	Ketavet100 [100 mg/ml]
0,1 ml	Rompun 5 % [50 mg/ml], TS 500 mg (Bayer, Art.Nr.: 03407)
6,00 ml	physiologische Kochsalzlösung [0,9 % NaCl]

– Fentanyl Gebrauchslösung (Schmerzmittel; 0,5 µg/50 µl je 10 g Körpergewicht)

1,00 ml	Fentanyl Stammlösung [50 µg/ml]
ad 5,00 ml	Injektionslösung [Braun, Melsungen]

### 8.1.9.3 Aufarbeitung der exponierten Tiere

– Narkoselösung (für die Einschläferung; 25 µl IP pro 10 g Körpergewicht)

10,0 ml	Ketavet100 [100 mg/ml]
0,22 ml	Rompun 5 % [50 mg/ml], TS 500 mg (Bayer, Art.Nr.: 03407)

### 8.1.9.4 Isolation von RNA aus Mausgewebe

– 0,1 % DEPC-Wasser

1 ml	DEPC, 0,1 % Dithylpyrokarbonat
ad 1 l	destilliertes Wasser
über Nacht rühren lassen	
3 x 20 min autoklavieren	



---

- **Glycogen Herstellung (20 mg/1 ml)**

200 mg      Glycogen  
10,0 ml    0,1 % DEPC-Wasser

- **NH<sub>4</sub>Ac (10 M)**

77 g          NH<sub>4</sub>Ac  
100 ml      destilliertes Wasser

- **NH<sub>4</sub>Ac (10 mM)**

1 ml          NH<sub>4</sub>Ac (10 M)  
999 ml      destilliertes Wasser

- **70 % Ethanol**

700 ml                  Ethanol 100 %  
ad 1000 ml          0,1 % DEPC-Wasser

### **8.1.9.5    Gel für Elektrophorese**

- **1 % Agarosegel für RNA-Gelelektrophorese (für die RNA-Qualitätskontrolle)**

2 g              Agarose  
200 ml      0,1 % DEPC-Wasser  
20 µl      SYBR-Gold (10.000 x, Invitrogen)

- **2 % Agarosegel für DNA-Gelelektrophorese (für die Primervalidierung)**

4 g              Agarose  
200 ml      1 x TBE  
20 µl      SYBR-Green (10.000 x, Invitrogen)

- **10 x TBE (Stammlösung)**

323,7 g    Tris-Base  
57,2 g    Borsäure  
19,1 g    Na<sub>2</sub>EDTAx2H<sub>2</sub>O  
ad 2 l    destilliertes Wasser  
2 x autoklavieren

- **1 x TBE (für 2 % Agarosegel für DNA-Gelelektrophorese)**

100 ml      10X TBE  
Ad 1 l      destilliertes Wasser

---

– 0,5 x TBE (für Laufpuffer)

100 ml 10 x TBE

Ad 2 l 0,1 % DEPC-Wasser

### 8.1.9.6 Herstellung von Proteinlysaten aus eukaryotischem Gewebe

– Lysis Puffer (Gebrauchslösung)

10 µl Proteinase Inhibitor Cocktail III (Merck)

990 µl 1 x PBS

### 8.1.9.7 Westernblot

– 1 x PBS (Stammlösung)

9,49 g PBS (Biochrom)

ad 10 l destilliertes Wasser

auf pH 7,4 einstellen

– 1 x PBS (Gebrauchslösung)

100 ml 10 x PBS

Ad 1 l destilliertes Wasser

– 1 x PBS-T (Gebrauchslösung)

100 ml 10 x PBS

900 ml destilliertes Wasser

0,1 ml Tween20

auf pH 7,4 einstellen

– 1 x Transferpuffer (Gebrauchslösung für des Blotten)

50 ml NuPage Transfer Buffer 20 x

1 ml NuPage Antioxidant

200 ml Methanol (20 % Endkonzentration)

749 ml destilliertes Wasser

auf pH 7,4 einstellen

– Blocklösung (Gebrauchslösung)

5 g Magermilchpulver

100 ml 1 x PBS-T

auf pH 7,4 einstellen

---

### 8.1.9.8 Durchflusszytometrie (FACS)

– 1 x PBS (Stammlösung)

9,49 g     PBS (Biochrom)  
ad 10 l     destilliertes Wasser  
auf pH 7,4 einstellen

– 30 % NaN<sub>3</sub> (Gebrauchslösung)

0,98 g     NaN<sub>3</sub>  
50 ml     1 x PBS

– 2 % NaN<sub>3</sub> (20 mM, Gebrauchslösung)

0,13 g     NaN<sub>3</sub>  
100 ml     1 x PBS

– FACS-Puffer (Gebrauchslösung)

5 g             BSA (Sigma)  
660 µl     30 % NaN<sub>3</sub>  
1 l             1 x PBS  
auf pH 7,4 einstellen  
sterilfiltrieren

– NH<sub>4</sub>Cl (0,17 M, Gebrauchslösung)

9,1 g     NH<sub>4</sub>Cl (Sigma)  
1 l             destilliertes Wasser (autoklaviert)  
Sterilfiltrieren

– Tris-HCl (Gebrauchslösung)

28,8 g     Tris-HCl (Sigma)  
1 l             destilliertes Wasser (autoklaviert)  
auf pH 7,4 einstellen  
sterilfiltrieren

– NH<sub>4</sub>Cl-Tris (Gebrauchslösung für die Erythrozyten-Lyse)

450 ml     NH<sub>4</sub>Cl (0,17 M, Gebrauchslösung)  
50 ml     Tris-HCl (0,8 M)

---

– **SA-Cy (1 mg/ml; Gebrauchslösung)**

1 mg	SA-Cy (Streptavidin-Cascadeyellow; eBioscience)
100 µl	2 % NaN <sub>3</sub>
900 µl	1 x PBS

– **PI (Propidium-Jodid; 20 µg/ml Stocklösung)**

10 µl	PI (Propidium-Jodid [2 mg/ml]; Sigma)
990 µl	1 x PBS

## **Danksagung**

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. H. Schulz, der mir als Leiter des Instituts für Inhalationsbiologie des Helmholtz Zentrum München (HZM) die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation zu erstellen. Die ausgezeichnete Ausstattung des Instituts hat wesentlich zur Durchführung zahlreicher Experimente und der Fertigstellung meiner Dissertation beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. T. Stöger für die Überlassung des Themas der Dissertation und die Betreuung und Unterstützung während des gesamten Projektes. Herr Dr. T. Stöger hat sich mit großem Interesse am Fortgang dieser Arbeit beteiligt.

Mein Dank gilt auch insbesondere Frau Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp für die durchgehende hervorragende Betreuung und Vertretung der Arbeit innerhalb der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ganz besonders danke ich meinen Kollegen Frau Dr. I. Bolle sowie Frau M. Neuner, die mich auch in schwierigen Phasen ermutigten und motivierten, sowie für ihre zahlreichen hilfreichen wissenschaftlichen Ratschläge.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Inhalationsbiologie des HZM sage ich herzlichen Dank für die freundliche Hilfe. Hier möchte ich mich vor allem bei Frau B. Frankenberger, Herr M. Krumpel und Frau B. Ritter bedanken, die durch technische Expertise und/oder stetige Diskussionsbereitschaft zum Erfolg dieser Studie beigetragen haben. Unter diesen Bedingungen war es mir immer eine große Freude hier zu arbeiten. Wesentlich zum Gelingen meiner chirurgischen Infusionsexperimente hat Herr Dr. L. Ruprecht beigetragen, wofür ich mich aufrichtig bei ihm bedanke.

Herzlichen Dank auch an die Kooperationspartner Herr Prof. Dr. D. Busch, Herr Dr. Thure Adler sowie Frau K. Kutzner und Frau C. Führmann (Immunoscreen der German Mouse Clinic des HZM) für die gute Zusammenarbeit in der Durchführung und Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen. Ebenso danke ich Herrn Dr. A. Stampfel und Frau M. Maier des Instituts für Toxikologie des HZM für die gute und freundliche Zusammenarbeit bei der Charakterisierung und Herstellung der Partikelsuspensionen für das Infusionsexperiment.

Zum Schluss möchte ich von ganzem Herzen meiner Frau, meinen Eltern und meinen Schwiegereltern, die mir die Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht haben, danken. Vor allem danke ich Ihnen für die zeitliche Unterstützung bei der Betreuung meines Sohnes und für das Verständnis, das Sie mir in stressvollen Zeiten schenkten. Mein besonderer Dank gilt hier meiner Frau.

# **Publikationen und Teilnahme an Fachtagungen**

## **Publikationen**

D. Ettehadieh<sup>1</sup>, S. Takenaka<sup>1</sup>, O. Schmid<sup>1</sup>, E. Karg<sup>1</sup>, A. Stampfl<sup>2</sup>, F. Eckardt-Schupp<sup>3</sup>,  
H. Schulz<sup>1</sup>, T. Stoeger<sup>1</sup>:

Systemic Effects of Inhaled Ultrafine Particles: Impact of Particle Translocation.

<sup>1</sup> Institute of Lung Biology and Disease, <sup>2</sup> Institute for Toxicology, <sup>3</sup> Institute of Radiation Biology, Helmholtz Zentrum München - German Research Center for Environmental Health, Germany

(Manuskript in Bearbeitung)

## **Vorträge und Poster auf Fachtagungen**

### **INTERACT - Munich PhD Symposium 2007**

D. Ettehadieh, S. Takenaka, E. Karg, H. Schulz, T. Stoeger:

Health effects of inhaled ultrafine carbon particles - Impact of particle translocation

### **18<sup>th</sup> EFCA International Symposium, FZK, Germany, June 11 and 12, 2007**

D. Ettehadieh, T. Stoeger, S. Takenaka, E. Karg, H. Schulz:

Systemic effects of inhaled ultrafine carbon particles on the progress of inflammatory and cardiovascular diseases

### **2<sup>nd</sup> Nanotoxicology conference, Italien/Venedig, Apr 19-21, 2007**

D. Ettehadieh, T. Stoeger, S. Takenaka, E. Karg, H. Schulz:

Systemic effects of inhaled ultrafine carbon particles in mice

### **HEI Annual Conference 2007**

D. Ettehadieh; T. Stoeger; H. Schulz:

Systemic effects of inhaled ultrafine carbon particles on the progress of inflammatory and cardiovascular diseases

# Lebenslauf

Name Dariusch Ettehadieh

Geburtsdatum 23.01.1974

Geburtsort Karlsruhe

## Schulausbildung

06/1995 allgemeine Hochschulreife am Heisenberg Gymnasium  
in Karlsruhe

## Zivildienst

08/1995 – 08/1996 Lebenshilfe e.V. in Wörth am Rhein

## Hochschulausbildung

10/1996 – 02/2005 Studium der Biologie an der Universität Karlsruhe (TH)  
Abschluss mit Diplom

05/2005 – 04/2009 Promotion am Institut für Inhalationsbiologie, Helmholtz  
Zentrum München

# **Erklärung**

Diese Doktorarbeit wurde am Helmholtz Zentrum München im Institut für Inhalationsbiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Holger Schulz angefertigt.

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

München, den 01.04.2009

---

Dariusch Ettehadieh